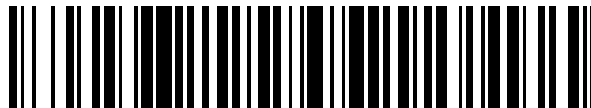


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 836**

51 Int. Cl.:

A61K 39/155 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2012 PCT/US2012/022762**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012 WO12103361**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2012 E 12702153 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2667892**

54 Título: **Régimen de inmunización del VRS**

30 Prioridad:

26.01.2011 US 201161436355 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.10.2019

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)

Rue de l'Institut 89

1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

DORMITZER, PHILIP, R.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 727 836 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Régimen de inmunización del VRS

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 61/436.355, presentada el 26 de enero de 2011.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de secuencias que se ha sometido en formato ASCII mediante EFS-Web. Dicha copia ASCII, creada el miércoles 25 de enero de 2012, se denomina 85448116.txt y tiene 15.682 bites de tamaño.

10 **Antecedentes**

15 El virus respiratorio sincicial (VRS) es una envoltura de ARN de hebra negativa no segmentada de la familia *Paramyxoviridae*, género *Pneumovirus*. Es la causa más común de bronquiolitis y neumonía entre niños en su primer años de vida. VRS produce también infecciones repetidas que incluyen enfermedades graves del tracto respiratorio inferior, que se pueden producir a cualquier edad, especialmente con aquellos con los sistemas cardíaco, pulmonar, o inmunitario comprometidos.

20 Para infectar una célula hospedadora, los paramixovirus tales como VRS, al igual que otros virus con envoltura tales como el virus paragripal y el VIH, requieren la fusión de la membrana vírica con la membrana de una célula hospedadora. Para el VRS, la proteína de fusión conservada (VRS F) se fusiona con las membranas víricas y celulares acoplándose al repliegado irreversible de la proteína con yuxtaposición. En los modelos actuales basados en estudios con paramixovirus, la proteína VRS F se pliega inicialmente en una conformación de "prefusión" metaestable. Durante la entrada celular, la conformación de la prefusión experimenta el repliegado y cambios conformacionales en su conformación de "postfusión" estable.

25 La proteína VRS F se traduce desde el ARNm en una proteína de aproximadamente 574 aminoácidos designada F₀. El procesamiento posterior a la traducción de F₀ incluye la eliminación de un péptido de señalización en el extremo N mediante una peptidasa de señalización en el retículo endoplásmico. F₀ se escinde también en dos sitios (aproximadamente 109/110 y aproximadamente 136/137) mediante proteasas celulares (en particular furina) en el trans-Golgi. Esta escisión da como resultado la eliminación de una secuencia interviniente corta y genera dos subunidades F₁ (~50 kDa; Extremo C; aproximadamente los restos 137-574) y F₂ (~20 kDa; Extremo N; aproximadamente los restos 1-109) que permanecen asociados entre sí. F₁ contiene un péptido de fusión hidrófobo en su extremo N y también dos regiones de repetición de septeto anfifáticas (HRA y HRB). HRA está próxima al péptido de fusión y HRB está próxima al dominio transmembrana. tres heterodímeros F₁-F₂ se ensambla como homotrímeros de F₁-F₂ en el virión. No se encuentra disponible actualmente una vacuna adecuada para bebés frente a la infección por VRS, pero se desea.

35 Intentos anteriores de vacunas para el VRS han conducido a ensayos clínicos fallidos en los que la vacuna no protege contra la infección, y de hecho, se asoció con un riesgo creciente de enfermedad por VRS grave cuando el niño vacunado llegó a infectarse. Kim, H.W., y col., Am. J. Epidemiol., 89:422-434 (1969). No están disponibles los procedimientos de inmunización tradicionales para vacunar bebés. Englund J y col. Vaccine 16 (1998) 1456-1463 describe la protección de bebés contra determinadas inmunizaciones mediante la inmunización de la madre durante el embarazo, e indica que esta se está considerando para el VRS, tras la cual, podría considerarse la inmunización de bebés más mayores con vacunas vivas atenuadas.

40 Por lo tanto, son necesarios regímenes de inmunización de VRS mejorados.

Sumario

45 La invención se refiere a una composición inductora de respuestas inmunitarias contra el virus respiratorio sincicial (VRS) que proporciona uno o más antígenos de VRS, para su uso en un procedimiento para proporcionar inmunidad protectora contra el VRS o la protección de una enfermedad producida por el VRS en un bebé, en el que el procedimiento comprende administrar al bebé a aproximadamente los 4 meses de edad o más joven, la composición inductora de la respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS, en el que dicho bebé era un recién nacido de una mujer a la cual se administró una composición que proporciona uno o más antígenos de VRS que inducía una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS durante el tiempo en el que dicha mujer estuvo embarazada de dicho bebé, en el que el uno o más antígenos de VRS comprenden una glicoproteína VRS F. Por consiguiente, los procedimientos desvelados para proporcionar inmunidad protectora frente al VRS en un bebé, comprenden (a) administrar una composición inductora de una primera respuesta inmunitaria contra VRS a una mujer durante el embarazo; y (b) administrar una segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS al bebé que ha nacido del embarazo.

La divulgación se refiere también a los procedimientos para proteger a un bebé de la enfermedad producida por el VRS, que comprenden administrar a un bebé una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS, en el que el bebé nació de una mujer a la cual se administró una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS durante el tiempo en el la mujer estuvo embarazada del bebé.

- 5 En algunos aspectos la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada a una mujer durante el embarazo refuerza la respuesta de un anticuerpo neutralizante en la mujer. La respuesta del anticuerpo neutralizante puede caracterizarse por un aumento de 2 veces o más en el título neutralizante. La respuesta del anticuerpo neutralizante puede caracterizarse por anticuerpos neutralizantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos neutralizantes son independientes del complemento. En algunas realizaciones, la administración a una
10 mujer durante el embarazo se lleva a cabo durante el segundo o tercer trimestre del embarazo. En algunas realizaciones, La administración al bebé nacido del embarazo se produce inmediatamente después del nacimiento, aproximadamente 2 semanas después del nacimiento, aproximadamente 4 semanas después del nacimiento, aproximadamente 6 semanas después del nacimiento, aproximadamente 2 meses después del nacimiento, aproximadamente 3 meses después del nacimiento o aproximadamente 4 meses después del nacimiento.
- 15 En algunas realizaciones, la primera composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS y la segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS son iguales. Las primeras composiciones inductoras de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS pueden cada una comprender una composición con una subunidad del VRS, un ácido nucleico, una partícula de un replicón vírico, un virus atenuado vivo, una partícula vírica inactivada, un vector vírico recombinante, o una partícula similar a virus. Las composiciones
20 inductoras de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS comprenden cada una uno o más péptidos o una composición de un virosoma.

- En algunas realizaciones, la primera composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS no es igual a la segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS. La primera composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS puede comprender una composición de una subunidad
25 del VRS, un ácido nucleico, o una partícula de un replicón vírico; y la segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS puede comprender una composición de una subunidad del VRS, un ácido nucleico, o una partícula de un replicón vírico; con la condición de que la primera y la segunda composiciones inductoras de una respuesta inmunitaria dirigidas contra el VRS no sean ambas una composición de una subunidad del VRS, un ácido nucleico o una partícula de un replicón vírico. La primera composición inductora de una respuesta inmunitaria
30 dirigida contra el VRS puede comprender una composición de una subunidad del VRS, un ácido nucleico, un vector vírico recombinante, o una partícula de un replicón vírico; y la segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS puede comprender una composición de una subunidad del VRS, un ácido nucleico, un vector vírico recombinante, o una partícula de un replicón vírico; con la condición de que la primera y la segunda composiciones inductoras de una respuesta inmunitaria dirigidas contra el VRS no sean ambas una composición de
35 una subunidad del VRS, un ácido nucleico o una partícula de un replicón vírico. En algunas realizaciones, la primera composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra RSV comprende una composición de una subunidad de VRS. En algunas realizaciones, la segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS comprende un ácido nucleico o una partícula de un replicón vírico. En algunas realizaciones, la segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS comprende un ácido nucleico, un vector
40 vírico recombinante, o una partícula de un replicón vírico.

- En un aspecto preferido, la primera composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS que se administra a una mujer durante el embarazo no se replica en la mujer tras la administración, y la segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS que se administra al bebé que ha nacido del embarazo no se replica por sí misma o su genoma en el bebé. Por ejemplo, la primera composición inductora de una respuesta
45 inmunitaria dirigida contra el VRS puede ser, por ejemplo, una composición de una subunidad del VRS, una partícula similar el virus del VRS (VLP), uno o más péptidos del VRS, una composición del epitopo mimético, una composición virosómica, o una composición de un virión del VRS destruido, y la segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico autorreplicante (por ejemplo, un ARN autorreplicante (autoamplificante), un virus atenuado vivo, un virus vivo heterólogo (por ejemplo un virus relacionado con el VRS con un hospedador humano no primario), un vector vírico vivo, un virus vivo quimérico, o una partícula de
50 un replicón vírico.

Breve descripción de las Figuras

- Las FIGS. 1A y 1B son gráficos que muestran la correlación entre los títulos de neutralización del suero y la protección del estímulo del VRS en ratas del algodón (FIG. 1A) o ratones BALB/c (FIG. 1B). Las ratas del algodón y los ratones se inyectaron por vía i.p. con suero donante que contenía diferentes niveles de anticuerpo específico del VRS (véanse los procedimientos del Ejemplo 3 y las Tablas 3 y 4 para más detalles) y se estimularon i.n. con VRS 2 días después. Cada círculo representa el título de neutralización del suero un día después de la transferencia y la carga vírica del pulmón después del estímulo (5 días después del estímulo para las ratas del algodón, 4 días después del estímulo para ratones) para un animal individual. Las líneas punteadas indican los límites de detección del ensayo, y la línea
55 sólida muestra la curva que mejor se ajusta a 4 parámetros para los datos usados para calcular el título de neutralización correlacionado con el virus no detectable tras el estímulo.
- 60

Descripción detallada

5 Como se describe en el presente documento, los inventores han descubierto un régimen de inmunización por el cual, un bebé se protege contra el virus respiratorio sincicial (VRS) mediante la administración de una primera composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS a este o a su madre (es decir, una mujer embarazada) durante el embarazo, seguido por la administración de una segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS al bebé tras el nacimiento. La inmunización de la mujer embarazada proporciona inmunidad mediada por anticuerpo mediante la inmunidad materna pasiva. La inmunidad pasiva se produce naturalmente cuando se transfieren anticuerpos materna al feto mediante la placenta.

10 La inmunidad pasiva es especialmente importante debido a que los bebés nacen sin ninguna inmunidad adquirida activamente. La administración de una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS a una mujer embarazada potencia la inmunidad al VRS en la mujer, y los anticuerpos dirigidos contra el VRS se transmiten al recién nacido a través de la placenta, confiriendo inmunidad materna pasiva al bebé. Sin embargo, la inmunidad pasiva en bebés es solo temporal y comienza a disminuir a las pocas semanas, o meses de vida. Ya que la inmunidad pasiva es solo temporal, es importante para el bebé recibir la administración de una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS, para inducir la inmunidad activa en el bebé, antes que disminuya la inmunidad pasiva. La administración de una segunda composición inmunógena al bebé tras el nacimiento induce la inmunidad activa frente al VRS en el bebé, y extiende la inmunidad transmitida por la madre durante el embarazo.

20 El régimen de inmunización descrito en el presente documento proporciona algunas ventajas. Por ejemplo, esta estrategia proporciona protección de la infección por el VRS al bebé desde el nacimiento. Una ventaja adicional es que la administración de una composición de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS al bebé de acuerdo con el régimen descrito en el presente documento puede dar como resultado una inducción mayor de la inmunidad del VRS neutralizante que las estrategias anteriores a la inmunización del bebé. El pico de enfermedad grave debido al VRS se produce a aproximadamente los dos a tres meses de edad. La inmunización de mujeres embarazadas, que aumenta sus títulos de anticuerpo y los títulos de anticuerpos pasivos en sus bebés, podría retrasar el inicio de enfermedad producida por VRS en bebés hasta un momento en el que sus sistemas respiratorios sean más maduros y sea menos probable que lleguen a enfermarse gravemente. El sistema inmunitario del recién nacido es inmaduro, haciendo que la inmunización activa de recién nacidos sea menos eficaz que la inmunización de bebés más mayores. El retraso de la enfermedad del VRS en bebés debido a una inmunidad pasiva potenciada procedente de la inmunización de la mujer embarazada permitirá más tiempo para la inmunización activa del bebé antes de la edad de mayor riesgo de enfermedad grave. Este tiempo añadido para la inmunización eficaz podría permitir proporcionar múltiples dosis de vacunas a un bebé y/o proporcionar dosis más tarde durante la infancia, cuando el sistema inmunitario es más maduro pero antes aún de la primera infección del VRS del bebé o de la enfermedad producida por el VRS.

35 Tal como se usa en el presente documento, un bebé es un individuo de un año de edad (por ejemplo, menos de un día de edad, 1 semana de edad, 2 semanas de edad, 3 semanas de edad, 4 semanas de edad, 2 meses de edad, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses de edad, 9 meses de edad, 10 meses de edad, 11 meses de edad, menos de 12 meses de edad).

40 Tal como se usa en el presente documento, una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS es cualquier composición que sea adecuada para la administración a un mamífero y es eficaz para inducir la inmunidad activa o el refuerzo de una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta inmunoprotectora, contra el VRS. La composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS proporcionará uno o más antígenos del VRS, y puede estar en la forma de, por ejemplo, una composición de una subunidad que comprende un antígeno de la proteína VRS, un ácido nucleico que codifica un antígeno de una proteína VRS, una partícula de un replicón vírico (VRP) que contiene un ácido nucleico que codifica un antígeno de una proteína del VRS, virus atenuados vivos, virus inactivados, partículas similares a virus (VLP), o vectores víricos recombinantes. El antígeno del VRS puede ser cualquier antígeno del VRS deseado. Por ejemplo, la composición inductora de respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS puede comprender una glicoproteína del VRS o una porción de la misma (por ejemplo, el ectodominio), preferentemente, una glicoproteína VRS F. La glicoproteína del VRS puede estar en cualquier conformación (por ejemplo, conformación de tipo prefusión, conformación de tipo postfusión) o una mezcla de conformaciones. El antígeno del VRS administrado a la mujer embarazada y al bebé puede ser de diferentes serogrupos, diferentes serotipos, diferentes inmunotipos, diferentes serovares, diferentes biovares, diferentes cepas, diferentes clados, o diferentes especies y/o puede contener mutaciones (por ejemplo, delecciones). El antígeno del VRS administrado a la mujer embarazada y al bebé puede ser de diferentes subtipos.

55 Las composiciones inductoras de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS usadas en el régimen de inmunización pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, se puede administrar a una mujer una composición de una subunidad del VRS, un ácido nucleico, una partícula de replicación vírica (VRP) o un virus atenuado durante el embarazo y se administra al bebé la misma o diferente composición de la subunidad del VRS, un ácido nucleico, una partícula de replicación vírica (VRP) o un virus atenuado tras el nacimiento. En otro ejemplo, se puede administrar a la mujer un virus atenuado durante el embarazo y se administra al niño una composición de una subunidad del VRS, un ácido nucleico o una VRP tras el nacimiento. En algunos casos, se administran al bebé y a la mujer embarazada

vacunas atenuadas. En otros casos, se administran al bebé y a la mujer embarazada la misma o diferente composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS seleccionada entre el grupo que consiste en composiciones de una subunidad del VRS, ácidos nucleicos, y VRP. En otros casos más, se administra al bebé un estímulo con una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS y se administra un refuerzo con otra composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS. Por ejemplo, el bebé puede ser estimulado con un ácido nucleico y reforzado con una composición de una subunidad. En algunos casos, Se administran a cada uno del bebé o la mujer embarazada o al bebé y la mujer embarazada composiciones inductoras de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS simultáneamente. Por ejemplo, el bebé, Se pueden administrar a cada uno de la mujer embarazada, o el bebé y la mujer embarazada un ácido nucleico y una composición de una subunidad simultáneamente.

En algunas realizaciones, la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada a la mujer y la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada al bebé no son iguales. Por ejemplo, la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada a la mujer puede comprender una composición de una subunidad del VRS, un ácido nucleico o una VRP, y la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada al bebé puede comprender una composición de una subunidad del VRS, un ácido nucleico o una VRP, con la condición de que las composiciones inductoras de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administradas a la mujer y al bebé no sean ambas una composición de una subunidad del VRS, un ácido nucleico o una partícula de replicación vírica.

La composición inductora de una respuesta inmunitaria contra el VRS administrada a la mujer será más probablemente un refuerzo. Por ejemplo, la mujer habrá experimentado probablemente una infección por VRS en algún momento de su vida antes del embarazo, de tal manera que la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada a la misma durante el embarazo actuará como un estímulo. El refuerzo aumentará el título de anticuerpo dirigido contra VRS en la madre y potenciará la inmunidad materna que se transmite al feto y al bebé.

Se puede administrar a la mujer embarazada la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS en cualquier momento durante su embarazo. Por ejemplo, se puede administrar a la mujer la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS durante el primer, segundo o tercer trimestre de su embarazo. En algunas realizaciones, la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS se administra a la mujer durante las últimas 6-12 semanas del embarazo (por ejemplo, 28 semanas de gestación, 29 semanas de gestación, 30 semanas de gestación, 31 semanas de gestación, 32 semanas de gestación, 33 semanas de gestación, 34 semanas de gestación, 35 semanas de gestación, 36 semanas de gestación, 37 semanas de gestación, 38 semanas de gestación, 39 semanas de gestación). Preferentemente, la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS se administra a la mujer embarazada al menos durante cuatro semanas antes de la administración al bebé.

En algunas realizaciones, se administra un régimen de una dosis a la mujer embarazada entre las 32 y 36 de gestación.

En otras realizaciones, se administra un régimen de dos dosis a la mujer embarazada, administrándose la primera dosis a aproximadamente las 32 semanas de gestación y administrándose la segunda dosis a aproximadamente las 36 semanas de gestación.

Se puede administrar al bebé una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS en cualquier momento durante el primer año de vida, y posteriormente si se desea. Generalmente se administrará al bebé una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS una, dos, tres, cuatro o más veces durante el primer año de vida, y las composiciones pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, se puede administrar una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS al bebé una o más veces seleccionada a partir del nacimiento, a las 2 semanas de edad, 4 semanas de edad, 6 semanas de edad, 2 meses de edad, 3 meses de edad, 4 meses de edad, 6 meses de edad, 9 meses de edad, y 12 meses de edad. Preferentemente, se administra al bebé la composición inductora de la respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS en un momento antes de que hayan disminuido los anticuerpos maternos a títulos no protectores, por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS se administra inicialmente al bebé a aproximadamente los 4 meses de edad o más joven. Se pueden producir administraciones posteriores en cualquier calendario deseado.

Por ejemplo, se puede administrar una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS al bebé como un régimen de tres dosis. Un posible régimen de dosificación incluye la administración en el momento del nacimiento, 1 mes de edad, y 2 meses de edad. Otro posible régimen de dosificación incluye la administración a 1 mes de edad, 2 meses de edad y 3 meses de edad. Otro régimen de dosificación ilustrativo incluye la administración a 1 mes de edad, 2 meses de edad y 4 meses de edad.

La administración de la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS puede ser en prácticamente el mismo momento que otras vacunas (por ejemplo, durante la misma consulta o visita médica a un profesional sanitario o a un centro de vacunación) o en un momento más inicial dado, al principio del comienzo de la enfermedad del VRS.

En algunas realizaciones, la composición inductora que induce la respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS comprende proteínas, moléculas de ADN, moléculas de ARN autorreplicantes o VRP. La composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS puede comprender además un transportador farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un adyuvante. Véanse, por ejemplo, el documento U.S. 6.299.884; el documento U.S. 7.641.911; el documento U.S. 7.306.805; y el documento US 2007/0207090. Determinadas composiciones inductoras de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS se describen además en el presente documento.

La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria mediada por células, o ambas. En algunas realizaciones se induce una respuesta inmunitaria contra cada proteína del VRS administrada. Una respuesta inmunitaria mediada por células puede comprender una respuesta de linfocitos T auxiliares (T_h), una respuesta de linfocitos T citotóxicos CD8+ (LTC), o ambas. En algunas realizaciones, las respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria humoral y los anticuerpos son anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes bloquean la infección vírica de las células. En algunas realizaciones la respuesta inmunitaria reduce o evita la infección de las células. Las respuestas de los anticuerpos neutralizantes pueden ser dependientes del complemento o independientes del complemento. En algunas realizaciones, la respuesta del anticuerpo neutralizante es independiente del complemento. En algunas realizaciones, la respuesta del anticuerpo neutralizante es la neutralización cruzada; es decir, un anticuerpo generado contra una composición administrada neutraliza un virus VRS de una cepa diferente de la cepa utilizada en la composición. En algunas realizaciones, la respuesta del anticuerpo neutralizante se caracteriza por neutralizar anticuerpos IgG.

Una medida útil de la potencia del anticuerpo en la técnica es el "% de neutralización del título" (por ejemplo, 50 % de neutralización del título, 60 % de neutralización del título). Para determinar el % de neutralización del título, el suero de los individuos inmunizados se diluye para evaluar cómo al diluir el suero puede retenerse además la capacidad de bloquear la entrada del 50 % o 60 %, respectivamente, de los virus infecciosos en las células. Por ejemplo, un 50 % de neutralización de un título de 20 significa que el suero retiene la capacidad de neutralizar el 50 % del virus tras diluirse 20 veces. Por lo tanto, títulos mayores indican respuestas de anticuerpos neutralizantes más potentes. En algunas realizaciones, este título está en un intervalo que tiene un límite inferior de aproximadamente 20, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100 o aproximadamente 200. La variación del título de neutralización del 50 % puede tener un límite superior de aproximadamente 40, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 400, aproximadamente 800, aproximadamente 1600, aproximadamente 3000, aproximadamente 6000, aproximadamente 8000, aproximadamente 10000 o aproximadamente 20000. Por ejemplo, el título de neutralización del 50 % puede ser de aproximadamente 1:20, 1:40, 1:80, o aproximadamente 1:100. "Aproximadamente" significa en dos veces del valor enumerado. El título de neutralización puede medirse como se describe en el presente documento.

El título de neutralización puede medirse mezclando una preparación de VRS con una preparación de anticuerpo, añadir la mezcla a células de mamífero cultivadas y a continuación determinar la proporción de infectividad del VRS original que permanece en la mezcla de anticuerpo-virus evaluando las consecuencias de añadir la mezcla a las células. La preparación que contiene el anticuerpo puede incluir, por ejemplo, suero animal, suero humano, anticuerpos purificados a partir de suero, o anticuerpos monoclonales a partir del cultivo. En algunos casos el complemento, por ejemplo, el complemento de cobaya, puede mezclarse con el anticuerpo y la preparación del VRS. En algunas realizaciones, se añaden diluciones en serie de la preparación que contiene el anticuerpo a las muestras de virus. Las células de mamífero utilizadas en el ensayo de neutralización pueden estar en una monocapa o en suspensión, y pueden infectarse. el inóculo, que puede incluir virus y un anticuerpo, puede permanecer en las células o puede eliminarse después de un breve periodo de tiempo (por ejemplo, 30 minutos, 60 minutos, o 90 minutos). La proporción de células infectadas puede determinarse por una variedad de medios, incluyendo, por ejemplo, placas de recuento que forman una capa de revestimiento semisólida, sincitios de recuento que forman una capa de revestimiento semisólida, focos infecciosos inmunoteñidos tras una breve incubación con un virus, detección de un marcador fluorescente expresado en un VRS recombinante, identificación de células infectadas observando el efecto citopático, identificación de células infectadas mediante inmunotinción de un marcador del VRS, evaluar la cantidad del antígeno de VRS en el sobrenadante de células intactas o lisadas, detectar la cantidad de fluorescencia de un VRS recombinante que expresa un antígeno fluorescente, detectar la cantidad de lisis celular mediante un ensayo bioquímico (por ejemplo, LDH), y observar la dilución más alta de virus a la cual se observa cualquier efecto citopático tras un tiempo de incubación suficiente. Las variaciones adicionales en el ensayo de neutralización pueden incluir, por ejemplo, variaciones en los tampones, agentes bloqueantes, tiempos de incubación, controles, tipo de placa, temperaturas de incubación, medio de cultivo celular, agente permeabilizante, agente de fijación, tipo de sustrato celular, composición de revestimiento, tinción celular, volumen de reactivos, número de lavados, uso de anticuerpos secundarios, procedimiento de recuento, procedimiento de cálculo, y porcentaje de neutralización utilizado para calcular el título.

Se puede estimular una respuesta inmunitaria administrando una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS (una composición que comprende proteínas, moléculas de ADN, moléculas de ARN autorreplicantes o VRP) a un individuo. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida es una respuesta inmunoprotectora, es decir, la respuesta reduce el riesgo de infección por VRS, retrasa el inicio de infección por VRS, reduce el riesgo de enfermedad producida por VRS, redujo la gravedad de la enfermedad producida por VRS, retrasa

el inicio de enfermedad producida por VRS, reduce la frecuencia de enfermedad producida por VRS, reduce las secuelas de infección por VRS o enfermedad producida por VRS, o reduce el riesgo de que un individuo infectado por VRS contagie el VRS a otro individuo.

5 Se puede usar cualquier ruta de administración adecuada. Por ejemplo, una composición se puede administrar por vía intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica o intradérmica. Si se desea, la composición puede administrarse a través de una ruta intramucosal tal como mediante una ruta intraoral, intranasal, intravaginal, e intrarrectal. la administración a la mujer embarazada y al bebé puede ser a través de la misma ruta o de diferentes rutas. Las composiciones pueden administrarse de acuerdo con algún calendario adecuado.

10 Como se describe en el presente documento, se proporciona una inmunidad protectora frente a un VRS a un bebé que comprende las etapas de (a) administrar una primera composición inductora dirigida contra el VRS a la mujer durante el embarazo; y (b) administrar una segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS al bebé que ha nacido del embarazo. Como se describe en el presente documento, la primera composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS y la segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS pueden ser iguales o diferentes. Esta estrategia induce o refuerza preferentemente la neutralización de los anticuerpos dirigidos contra VRS en la mujer embarazada que se transmiten al bebé a través de la inmunidad materna, e induce una respuesta inmunitaria activa en el bebé. Por lo tanto, preferentemente, en el momento de la primera administración de la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS al bebé, el bebé contiene anticuerpos maternos contra el VRS, y como resultado de la administración desarrollará activamente una respuesta inmunitaria contra el VRS. Preferentemente, la composición de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS se administra al bebé en un momento en el que los anticuerpos maternos están aún a niveles protectores en el bebé.

25 En una realización particular, se proporciona una inmunidad protectora contra el VRS en un bebé administrando una composición de una subunidad dirigida contra el VRS a una mujer durante el embarazo; y administrando una composición de ARN autorreplicante dirigida contra el VRS a un bebé que ha nacido del embarazo. En una realización preferida, se proporciona una inmunidad protectora contra el VRS en un bebé administrando una composición de una subunidad dirigida contra el VRS a una mujer durante el embarazo; y administrar una o más composiciones de ARN autorreplicantes dirigidas contra el VRS a un bebé que ha nacido del embarazo, seguido por administrar una composición de refuerzo de la subunidad dirigida contra el VRS al bebé.

30 Como se describe en el presente documento, un bebé se protege de la infección producida por el VRS mediante un procedimiento que comprende administrar a un bebé una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS, en el que el bebé nació de una mujer a la cual se administró una composición de refuerzo o inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS durante el tiempo en el que la mujer estuvo embarazada del bebé. La composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS que se administró a la mujer y la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS que se administró al bebé pueden ser iguales o diferentes. Preferentemente, en el momento de la primera administración de la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS al bebé, el bebé contiene anticuerpos maternos contra el VRS, y como resultado de la administración desarrollará activamente una respuesta inmunitaria contra el VRS. Preferentemente, La composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS se administra al bebé en un momento en el que los anticuerpos maternos está aún en títulos protectores en el bebé.

40 En una realización preferida, un bebé se protege de la infección por VRS administrando una composición de ARN autorreplicante dirigida contra el VRS a un bebé nacido de una mujer a la que se administró una composición de una subunidad dirigida contra el VRS durante el tiempo que la mujer estuvo embarazada del bebé.

Composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS

45 Se puede usar cualquier composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS deseada. Por ejemplo, Las proteínas o fragmentos del VRS pueden administrarse directamente como componentes de una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS, o ácidos nucleicos que codifican una o más proteínas o fragmentos se pueden administrar para producir la proteína o fragmento de VRS *in vivo*, o se pueden administrar virus atenuados vivos, o se pueden administrar vectores víricos recombinantes que expresan proteínas de VRS, o se pueden administrar virus VRS, o se pueden administrar partículas análogas a virus que contienen antígenos de VRS. En determinadas realizaciones preferidas, tales como formulaciones de proteínas, Se describen además en el presente documento ácidos nucleicos recombinantes (por ejemplo, ARN autorreplicante) y alfavirus VRP que contienen secuencias que codifican proteínas o fragmentos de VRS.

Formulaciones de proteínas

55 Proteínas o fragmentos inmunógenos de las mismas usados de acuerdo con la invención se aislarán o purificarán normalmente. Por lo tanto, se separarán y diferenciarán del organismo o virión completo con el cual se encuentra la molécula en la naturaleza o está presente en la ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo.

El VRS existe como un único serotipo, pero tiene dos subgrupos antigénicos: A y B. Las glicoproteínas F de los dos

5 grupos son aproximadamente un 90 % idénticas. Se pueden usar en la invención el subgrupo A, el subgrupo B, o una combinación o híbrido de ambos en la invención. Una secuencia ilustrativa para el subgrupo A es la SEQ ID NO: 1 (cepa A2; Gi del GenBank: 138251; Swiss Prot P03420), y para el subgrupo B es la SEQ ID NO: 2 (cepa 18537; GI: 138250; Swiss Prot P13843). La SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2 tienen secuencias de 574 aminoácidos. El péptido de señalización en la cepa A2 tiene los a.a. 1-21, pero en la cepa 18537 tiene los a.a. 1-22. En ambas secuencias el dominio TM tiene aproximadamente los a.a. 530-550, pero se ha notificado alternativamente como 525-548.

SEQ ID NO: 1

```

1 MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE 60
61 LSNIKENKNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPPTNNRARELPRFMNYTLN 120
121 NAKKTNVTLSSKKRKRFLGFLLVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKAVVS 180
181 LSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLETREFSVN 240
241 AGVTTVPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV 300
301 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKV 360
361 QSNRVFCDTMNSLTLPSEINLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT 420
421 KCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGMDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDP 480
481 LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELHNVNAGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLS 540
541 LIAVGLLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN 574
    
```

SEQ ID NO: 2

```

1 MELLIHRSSAIFLTLAVNALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE 60
61 LSNIKETKNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRAREAPQYMNYTIN 120
121 TTKNLNVSISKKRKRFLGFLLVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKIKNALLSTNKAVVS 180
181 LSNGVSVLTSKVLDLKNYINNRLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQMNSRLLLETREFSVN 240
241 AGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV 300
301 VQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKV 360
361 QSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKT 420
421 KCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKLEGKNLYVKGEPIINYYDP 480
481 LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELHNVNTGKSTTNIMITTIIIVIIIVVLLS 540
541 LIAIGLLLYCKAKNTPVTL SKDQLSGINNI AFSK 574
    
```

15 Las proteínas de VRS pueden contener una o más mutaciones que evitan la escisión en uno o ambos sitios de escisión de la furina (es decir, los aminoácidos 109 y 136 de las SEQ ID NOS: 1 y 2). Estas mutaciones pueden evitar la agregación de los polipéptidos o proteínas solubles y por tanto facilitan las purificaciones, pueden evitar la fusión célula-célula si la proteína RSV F se expresa sobre la superficie de una célula, tal como mediante la expresión de un replicón vírico (partículas de replicón de alfavirus), o si la proteína VRS F es un componente de una partícula análoga a virus. Estas mutaciones, solas o en combinación con otras mutaciones descritas en el presente documento, pueden estabilizar también la proteína en la conformación de tipo prefusión.

20 Los ejemplos de mutaciones de escisión de furina adecuadas incluyen la sustitución de los restos de aminoácidos 106 - 109 de la SEQ ID NO: 1 o 2 con RARK (SEQ ID NO:3), RARQ (SEQ ID NO:4), QAQN (SEQ ID NO:5), o IEGR (SEQ ID NO:6). Como alternativa o además, los restos de aminoácidos 133 - 136 de la SEQ ID NO: 1 o 2 pueden sustituirse con RKKK (SEQ ID NO:7), ⊗⊗⊗R, QNQN (SEQ ID NO:8), QQQR (SEQ ID NO:9) o IEGR (SEQ ID NO:10). (⊗ indica que se ha eliminado el resto de aminoácido.) Estas mutaciones pueden combinarse, si se desea, con otras mutaciones descritas en el presente documento, tales como las mutaciones en la región p27 (aminoácidos 110-136 de las SEQ ID NOS: 1 o 2), incluyendo la delección de la región p27 completa o en parte.

25 Se pueden combinar estas mutaciones de escisión de la furina, si se desea, con otras mutaciones descritas en el presente documento, tales como mutaciones de escisión de la tripsina y mutaciones del péptido de fusión. Los ejemplos de mutaciones de escisión de la tripsina adecuadas incluyen la delección de cualquier resto de lisina o arginina entre aproximadamente la posición 101 y la posición 161 de la SEQ ID NO:1 o 2 o la sustitución de cualquiera de dichos restos de lisina o arginina con un aminoácido diferente de la lisina o arginina. Por ejemplo, los restos de lisina y/o arginina en la región p27 (aproximadamente los aminoácidos 110-136 de las SEQ ID NOS: 1 o 2) pueden sustituirse o eliminarse, incluyendo la delección de la región p27 completa o en parte.

30 Como alternativa o además de las mutaciones de escisión de la furina, los polipéptidos o proteínas RSV F pueden contener una o más mutaciones en la región del péptido de fusión (aminoácidos 137 y 153 de las SEQ ID NOS: 1 o 2). Por ejemplo, esta región puede eliminarse de forma completa o en parte.

35 En realizaciones particulares, la secuencia del resto de aminoácido 100 - 150 de la proteína VRS, tal como la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:2, o los ectodominios solubles de las mismas, son

(Delección 1 del péptido de fusión)

TPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKR-----SAIAS (SEQ ID NO:11), o

(Delección 2 del péptido de fusión)

TPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKR-----GVGSAIAS (SEQ ID NO:12).

5 Además de las mutaciones de escisión de la furina y mutaciones del péptido de fusión, o, de forma alternativa, las proteínas del VRS solubles, tales como las que carecen de la región transmembrana y la cola citoplásmica, las proteínas del VRS pueden contener una o más secuencias de oligomerización. Cuando está presente una secuencia de oligomerización, es preferentemente una secuencia de trimerización. Son bien conocidas en la técnica las secuencias de oligomerización adecuadas e incluyen, por ejemplo, la espiral enrollada de la proteína en cremallera de leucina GCN4 de levadura, La secuencia de trimerización de la fibritina del bacteriófago T4 ("foldon", y el dominio trimérico del HA paragripal. Se describen con más detalle en el presente documento estas y otras secuencias de oligomerización adecuadas.

15 Las proteínas o fragmentos de las mismas, se prepararán usualmente mediante la expresión en un sistema hospedador recombinante. En general, se producen (por ejemplo, las proteínas VRS) mediante la expresión de construcciones recombinantes que codifican las proteínas en células hospedadoras recombinantes adecuadas, aunque se pueden usar cualesquiera procedimientos adecuados. Las células hospedadoras recombinantes adecuadas incluyen, por ejemplo, células de insectos (por ejemplo, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni*), células de mamífero (por ejemplo, ser humano, primates no humanos, caballo, vaca, oveja, perro, gato, y roedor (por ejemplo, hámster), células de aves (por ejemplo, pollos, patos, y gansos), bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, y *Streptococcus* spp.), células de levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*), células de *Tetrahymena* (por ejemplo, *Tetrahymena thermophila*) o combinaciones de las mismas. Se conocen bien en la técnica muchas células de insectos y células de mamíferos adecuadas. Las células de insectos adecuadas incluyen, por ejemplo, células Sf9, células Sf21, células Tn5, células S2 de Schneider, y células High Five (un aislado clonado derivado de la línea de células BTI-TN-5B1-4 precursora de *Trichoplusia ni* (Invitrogen)). Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (células HEK293, transformadas normalmente por el ADN cizallado del adenovirus de tipo 5), células NIH-3T3, células 293-T, células Vero, células HeLa, células PERC.6 (número de depósito de ECACC 96022940), células Hep G2, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), células de pulmón de feto de rhesus (ATCC CL-160), células Madin-Darby de riñón de bovino ("MDBK"), células Madin-Darby de riñón de cánido ("MDCK") (por ejemplo, MDCK (NBL2), ATCC CCL34; o MDCK 33016, DSM ACC 2219), células de riñón de cría de hámster (BHK), tales como BHK21-F, células HKCC, y similares. Las células de ave adecuadas incluyen, por ejemplo, embriocitoblastos de pollo (por ejemplo, células EBx®), fibroblastos embrionarios de pollo, células germinales embrionarias de pollo, células de pato (por ejemplo líneas de células AGE1.CR y AGE1.CR.pIX cell lines (ProBioGen) que se describen, por ejemplo, en Vaccine 27:4975-4982 (2009) y WO2005/042728), células EB66, y similares.

40 Los expertos en la materia conocen sistemas de expresión de células de insectos adecuados, tales como sistemas de baculovirus, y se describen en, por ejemplo, Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987). los materiales y procedimientos para los sistemas de expresión de células de baculovirus/insectos están comercialmente disponibles en forma de kit de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA. Se conocen también los sistemas de expresión de células de aves por los expertos en la materia y se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 5.340.740; 5.656.479; 5.830.510; 6.114.168; y 6.500.668; la patente europea n.º EP 0787180B; la solicitud de patente europea n.º EP03291813.8; los documentos WO 03/043415; y WO 03/076601. De forma similar, se conocen también en la técnica los sistemas de expresión de células bacterianas y de mamíferos y se describen, por ejemplo, Yeast Genetic Engineering (Barr y col., eds., 1989) Butterworths, Londres.

45 Las construcciones recombinantes que codifican proteínas de VRS se pueden preparar en vectores adecuados utilizando procedimientos convencionales. Numerosos vectores adecuados para la expresión de proteínas recombinantes en células de insectos o mamíferos son bien conocidos y convencionales en la técnica. Los vectores adecuados pueden contener numerosos componentes, incluyendo, aunque no de forma limitativa uno o más de los siguientes: un origen de replicación; un gen marcador seleccionable; uno o más elementos de control de la expresión, tal como un elemento de control de la transcripción (por ejemplo, un promotor, un potenciador, un terminador), y/o una o más señales de traducción; y una secuencia de señalización o una secuencia líder para dirigirse a la ruta secretoria en una célula hospedadora seleccionada (por ejemplo de origen mamífero, o de una especie de mamífero o no mamífero heteróloga). Por ejemplo, para la expresión en células de insecto de un vector de expresión de baculovirus adecuado, tal como pFastBac (Invitrogen), se usa para producir partículas de baculovirus recombinantes. Las partículas de baculovirus se amplifican y se usan para infectar células de insectos que expresan la proteína recombinante. Para la expresión en células de mamífero, se usa un vector que impulsara la expresión de la construcción en la célula hospedadora del mamífero deseado (por ejemplo, células de ovario de hámster chino).

60 las proteínas pueden purificarse usando cualesquiera procedimientos adecuados. Por ejemplo, se conocen en la técnica procedimientos para purificar proteínas de VRS mediante cromatografía de inmovilización de afinidad. Ruiz-Arguello y col., J. Gen. Virol., 85:3677-3687 (2004). Los procedimientos adecuados para purificar proteínas deseadas que incluyen la precipitación y diversos tipos de cromatografía, tales como de interacción hidrofóbica, de intercambio iónico,

de afinidad, de quelación y de exclusión molecular son bien conocidos en la técnica. Se pueden crear esquemas de purificación adecuados usando dos o más de estos u otros procedimientos adecuados. Si se desea, las proteínas de VRS pueden incluir una "etiqueta" que facilita la purificación, tal como una etiqueta de epítipo o una etiqueta HIS. Dichas proteínas etiquetadas pueden purificarse convenientemente, por ejemplo, a partir de medio acondicionado, mediante cromatografía de quelación o cromatografía de afinidad. Las técnicas de purificación adicionales incluyen diafiltración y filtración en flujo tangencial.

Las proteínas pueden incluir secuencias adicionales además de las secuencias de VRS. Por ejemplo, un polipéptido puede incluir una secuencia para facilitar la purificación (por ejemplo, una secuencia poli-His con o sin un enlazador). De forma similar, a fines de expresión, el péptido líder natural puede estar sustituido por uno diferente.

En algunas realizaciones, las proteínas de VRS se administran usando partículas del replicón de alfavirus (VRP). Se puede usar cualquier secuencia de nucleótido que codifique una proteína de VRS para producir la proteína. Tal como se usa en el presente documento, el término "alfavirus" tiene su significado convencional en la técnica e incluye diversas especies tales como el virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEE; *por ejemplo*, Burro de Trinidad, TC83CR, V3014 etc.), Virus del bosque Semliki (SFV), Virus Sindbis, Virus del río Ross, Virus de la encefalitis equina occidental, Virus de encefalitis equina oriental, Virus Chikungunya, Virus S.A. AR86, Virus Everglades, Virus Mucambo, Virus del bosque Barmah, Virus Middelburg, Virus Pixuna, Virus O'nyong-nyong, Virus Getah, Virus Sagiyama, Virus Bebaru, Virus Mayaro, Virus Una, Virus Aura, Virus Whataroa, Virus Banbanki, Virus Kyzylgach, Virus J de las Highlands, Virus del Fuerte Morgan, Virus Ndumu, y Virus Buggy Creek virus.

Una "partícula de un replicón de alfavirus" (VRP) o una "partícula de replicón" es un replicón de alfavirus empaquetados con proteínas estructurales de alfavirus.

Un "replicón de alfavirus" (o "replicón") es una molécula de ARN que puede dirigir su propia amplificación *in vivo* en una célula diana. El replicón codifica la(s) polimerasa(s) que cataliza la amplificación del ARN (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) y contiene secuencias de ARN en cis requeridas para la replicación que se reconocen y utilizan por la(s) polimerasa(s) codificada(s). un replicón de alfavirus contiene normalmente los siguientes elementos ordenados: secuencias víricas en 5' requeridas para la replicación en cis, secuencias que codifican proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), secuencias víricas en 3' requeridas para la replicación en cis, y una extensión de poliadenilato. Un replicón de alfavirus puede contener también uno o más promotores de una "región de unión" subgenómica vírica que dirigen la expresión de secuencias de nucleótidos heterólogas, que pueden, en determinadas realizaciones, estar modificadas a fin de aumentar o reducir la transcripción vírica del fragmento subgenómico y la(s) secuencia(s) que se va(n) a expresar. Se pueden usar otros elementos del control, como se describe a continuación.

Los replicones de alfavirus que codifican una o más proteínas de VRS se usan para producir VRP. Dichos replicones de alfavirus comprenden secuencias que codifican una o más proteínas de VRS o fragmentos de las mismas. Estas secuencias se unen operativamente a uno o más elementos del control adecuados, tales como un promotor subgenómico, un IRES (por ejemplo, VEMC, EV71), y un sitio 2A vírico, que puede ser igual o diferente. Se pueden usar uno cualquiera o una combinación de elementos del control adecuados en cualquier orden.

El uso de vectores policistrónicos es un modo eficaz de proporcionar secuencias de ácidos nucleicos que codifican dos o más proteínas de VRS en cantidades relativas deseadas. En un ejemplo, un único promotor subgenómico está unido operativamente a dos secuencias que codifican dos proteínas de VRS diferentes, y un IRES se sitúa entre las dos secuencias de codificación. En otro ejemplo, dos secuencias que codifican dos proteínas de VRS diferentes se unen operativamente para separar los promotores. En otro ejemplo más, las dos secuencias que codifican dos proteínas de VRS diferentes se unen operativamente a un único promotor. Las dos secuencias que codifican dos proteínas de VRS diferentes se unen entre sí a través de una secuencia de nucleótidos que codifica un sitio 2A vírico, y codifica por tanto una única cadena de aminoácidos que contiene las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas del VRS. El sitio 2A vírico en este contexto se usa para generar dos proteínas de VRS a partir de la poliproteína original.

Promotores subgenómicos

Los promotores subgenómicos, conocidos también como promotores de la región de unión se pueden usar para regular la expresión de la proteína. Los promotores subgenómicos alfavíricos regulan la expresión de las proteínas estructurales alfavíricas. véanse Strauss y Strauss, "The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution", Microbiol Rev. sep. 1994;58(3):491-562. Un polinucleótido puede comprender un promotor subgenómico procedente de cualquier alfavirus. Cuando están presentes dos o más promotores subgenómicos, por ejemplo, en un polinucleótido policistrónico, los promotores pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, el promotor subgenómico puede tener la secuencia CTCTTACGGCTAACCTGAATGGA (SEQ ID NO:13). En determinadas realizaciones, los promotores subgenómicos pueden estar modificados a fin de aumentar o reducir la transcripción vírica de las proteínas. Véase la patente de Estados Unidos n.º 6.592.874.

Sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)

En algunas realizaciones, uno o más elementos de control es un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Un IRES

permite preparar múltiples proteína a partir de un único transcrito de ARNm como ribosomas que se unen a cada IRES e inician la traducción en ausencia de una caperuza 5', que se requiere normalmente para iniciar la traducción. Por ejemplo, se puede obtener el IRES a partir del genoma clonado del enterovirus 71 (EV71) o el virus de la encefalomiocarditis (VEMC).

5 Sitio 2A vírico

La proteína 2A del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) es un péptido corto que sirve para separar las proteínas estructurales del FMDV a partir de una proteína no estructural (FMDV 2B). Los trabajos iniciales sobre este péptido sugirieron que actúa como una proteasa autocatalítica, pero otro trabajo (por ejemplo, Donnelly y col., (2001), J.Gen.Virol.82, 1013-1025) sugiere que esta secuencia corta y el siguiente aminoácido individual de FMDV 2B (Gly) actúa como una parada-inicio de la traducción. Con respecto al modo preciso de acción, se puede insertar la secuencia entre dos polipéptidos, y efectuar la producción de múltiples polipéptidos individuales a partir de un único marco de lectura abierto. Las secuencias de FMDV 2A pueden insertarse entre las secuencias que codifican al menos dos proteínas de VRS, permitiendo su síntesis como parte de un único marco de lectura abierto. Por ejemplo, el marco de lectura abierto puede codificar una proteína RL11 y una proteína UL119 separada por una secuencia que codifica un sitio 2A vírico. A continuación se transcribe un único ARNm, durante la etapa de traducción, los péptidos RL11 y UL119 se producen por separado debido a la actividad del sitio 2A vírico. Se puede usar cualquier secuencia 2A vírica. A menudo, un sitio 2A vírico comprende la secuencia consenso Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-Pro, en la que X es un aminoácido (SEQ ID NO:14). Por ejemplo, la secuencia del péptido 2a del virus de la enfermedad del pie y la boca es DVESNPGP (SEQ ID NO: 15). Véase Trichas y col., "Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice", BMC Biol. 15 Sep 2008 15;6:40, y Halpin y col., "Self-processing 2A-polyproteins--a system for co-ordinate expression of multiple proteins in transgenic plants", Plant J. Feb 1999;17(4):453-9.

En algunas realizaciones, un replicón de alfavirus es un replicón quimérico, tal como un replicón quimérico de VEE-Sindbis (VCR), un replicón TC83 de la cepa VEE (TC83R), o un replicón quimérico TC83-Sindbis (TC83CR), o un replicón de V3014 de la cepa VEE. En algunas realizaciones, un VCR contiene la señal de empaquetamiento y el 3' UTR de un replicón de Sindbis en lugar de las secuencias en nsP3 y en el extremo 3' del replicón VEE; véase Perri y col., J. Virol. 77, 10394-403, 2003. En algunas realizaciones, un TC83CR contiene la señal de empaquetamiento y el 3' UTR de un replicón Sindbis en lugar de secuencias en nsP3 y en el extremo 3' de un replicón TC83 de una cepa VEE.

Producción de VRP

Son bien conocidos en la técnica los procedimientos de preparar VRP. En algunas realizaciones, se ensambla un alfavirus en un VRP utilizando una célula empaquetada. Una "célula empaquetada de alfavirus" (o "célula empaquetada") es una célula que contiene uno o más casetes de expresión de proteínas estructurales de alfavirus y que produce partículas de alfavirus recombinantes tras la introducción de un replicón de alfavirus, el sistema de inicio estratificado de un vector eucariota, por ejemplo, patente de Estados Unidos 5.814.482), o una partícula de alfavirus recombinante. El uno o más casetes de proteínas estructurales de alfavirus diferentes sirven como "auxiliares" proporcionando las proteínas estructurales de alfavirus. Un "casete de proteínas estructurales de alfavirus" es un casete de expresión que codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus y comprende al menos una y hasta cinco copias (es decir, 1, 2, 3, 4, o 5) de una secuencia de reconocimiento de una replicasa de alfavirus. Los casetes de expresión de proteínas estructurales comprenden normalmente, desde 5' a 3', una secuencia 5' que inicia la transcripción del ARN de alfavirus, un promotor opcional de la región subgenómica de alfavirus, una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína estructural del alfavirus, una región 3' sin traducir (que dirige también la transcripción del ARN), y una extensión poliA. Véanse, por ejemplo, el documento WO 2010/019437.

En una realización, dos diferentes casetes de proteínas estructurales de alfavirus (auxiliares defectuosos "divididos" se usan en un empaquetamiento de células para minimizar los episodios de recombinación que podrían producir un virus competente para la replicación. En algunas realizaciones un casete de proteínas estructurales de alfavirus codifica la proteína de la cápsida (C) pero no cualquiera de las glicoproteínas (E2 y E1). En algunas realizaciones, un casete de proteínas estructurales de alfavirus codifica la proteína de la cápsida y cualquiera de las glicoproteínas E1 o E2 (pero no ambas). En algunas realizaciones, un casete de proteínas estructurales de proteínas estructurales de alfavirus codifica las glicoproteínas E2 y E1, pero no la proteína de la cápsida. En algunas realizaciones, un casete de proteínas estructurales de alfavirus codifica la glicoproteína E1 o E2 (pero no ambas) y no la proteína de la cápsida.

En algunas realizaciones, Las VRP se producen por la introducción simultánea de replicones y ARN auxiliares en células de diversas fuentes. En estas condiciones, por ejemplo, BHKV o células Vero (1×10^7) se electroporan en, por ejemplo, 220 voltios, 1000 μ F, 2 pulsos manuales con 10 μ g de ARN de replicón: 6 μ g con ARN auxiliar con caperuza defectuosa: 10 μ g de ARN de Gly auxiliar defectuoso, El sobrenadante o las células que contienen VRP con VRS asociados se recogen ~24 horas después. Se pueden introducir también replicones y/o auxiliares en formas de ADN que inician los ARN adecuados en las células transfectadas.

Una célula empaquetada puede ser una célula de mamífero o una célula no de mamífero, tal como una célula de insecto (por ejemplo, SF9) o una célula de ave (por ejemplo, un polluelo mayor o un fibroblasto de pato o una línea de células de fibroblasto). Véase la patente de Estados Unidos 7.445.924. Las fuentes de células de aves incluyen, aunque

no de forma limitativa, embriocitoblastos de aves tales como EB66® (VIVALIS); células de pollo, incluyendo embriocitoblastos de pollo tales como células EBx®, embriofibroblastos de pollo, y células germinales embrionarias de pollo; células de pato (por ejemplo líneas de células AGE1.CR y AGE1.CR.pIX (ProBioGen) que se describen, por ejemplo, en Vaccine 27:4975-4982 (2009) y el documento WO2005/042728; y células de ganso. En algunas realizaciones, una célula empaquetada es un fibroblasto primario de pato o una línea de células de la retina de pato, tal como AGE.CR (PROBIOGEN).

Fuentes de células de mamífero para la introducción simultánea de ácido nucleico y/o las células empaquetadas incluyen, aunque no de forma limitativa, células de primate humano o no humano, incluyendo células PerC6 (PER.C6) (CRUCCELL N.V.), que se describen, por ejemplo, en los documentos WO 01/38362 y WO 02/40665, así como las depositadas con el número de depósito de la ECACC 96022940; MRC-5 (ATCC CCL-171); WI-38 (ATCC CCL-75); células de pulmón de feto de macaco (ATCC CL-160); células de riñón de embrión humano (por ejemplo, células 293, transformadas normalmente por ADN de adenovirus de tipo 5 cizallado); células VERO de riñones de mono; células de caballo, vaca (por ejemplo, células MDBK), oveja, perro (por ejemplo, células MDCK de riñones de perro, ATCC CCL34 MDCK (NBL2) o MDCK 33016, número de depósito DSM ACC 2219 como se describe en el documento WO 97/37001); gato, y roedor (por ejemplo, células de hámster tales como BHK21-F, células HKCC, células de ovario de hámster chino (CHO)), y pueden obtenerse de una amplia variedad de etapas de desarrollo, que incluyen, por ejemplo, adulto, neonato, feto, y embrión.

En algunas realizaciones, una célula empaquetada se transforma de manera estable con uno o más casetes de expresión de proteínas estructurales. Se pueden introducir casetes de expresión de proteínas estructurales en células utilizando técnicas de ADN recombinante normalizadas, incluyendo transferencia de ADN mediada por el policonjugado transferrina, transfección mediada con ácidos nucleicos puros o encapsulados, fusión celular mediada por liposoma, transporte intracelular de perlas de látex revestidas de ADN, fusión de protoplastos, infección vírica, electroporación, procedimientos de "pistola génica", y transfección mediada por DEAE o fosfato de calcio. Los casetes de expresión de proteínas estructurales se introducen normalmente en una célula hospedadora como moléculas de ADN, pero también se pueden introducir como ARN transcrito *in vitro*. Se puede introducir cada casete de expresión por separado o de forma prácticamente simultánea.

En algunas realizaciones, las líneas de células empaquetadas de alfavirus estables se usan para producir partículas de alfavirus recombinantes. Estas son células permisivas para el alfavirus que comprende casetes de ADN que expresan el ARN auxiliar defectuoso integrado de manera estable en sus genomas. Véase Polo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4598-603, 1999. Por ejemplo, en una realización los ARN auxiliares se expresan constitutivamente pero los proteínas estructurales del alfavirus no lo hacen, debido a que los genes están bajo el control de un promotor subgenómico de alfavirus (Polo y col., 1999). En otra realización, el promotor subgenómico no se usa en los ARN auxiliares para impulsar la expresión de la proteína estructural. Tras la introducción de un replicón de alfavirus en el genoma de una célula empaquetada mediante la transfección o infección por VRP, se producen enzimas replicasa y estimulan la expresión de los genes de la cápsida y la glicoproteína en los ARN auxiliares, y se produce la salida de VRP. se puede llevar a cabo la introducción del replicón mediante una variedad de procedimientos, incluyendo la transfección y la infección con una solución madre de siembra de partículas del replicón de alfavirus. A continuación se incubaba la célula empaquetada en condiciones y durante un tiempo suficiente para producir partículas empaquetadas de replicón de alfavirus en el sobrenadante del cultivo.

Por lo tanto, las células empaquetadas permiten a las VRP actuar como virus autopropagantes. Esta tecnología permite a las VRP producirse de la misma manera, y utilizar el mismo equipo, como el utilizado para las vacunas atenuadas vivas u otros vectores víricos que tienen líneas de células productoras disponibles, dichos vectores adenovíricos incompetentes para la replicación crecen en células que expresan los genes del adenovirus E1A y E1B.

En algunas realizaciones, se usa un procedimiento en dos etapas: la primera etapa comprende producir una solución madre de siembra de partículas de replicón de alfavirus transfectando una célula empaquetada con un replicón basado en ADN plásmido. A continuación se produce una solución madre mucho más grande de partículas de replicón en una segunda etapa, infectando un cultivo reciente de células empaquetadas con la solución madre de siembra. Esta infección puede llevarse a cabo usando diversas multiplicidades de infección (MOI), incluyendo una MOI=0,00001, 0,00005, 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 3, 5, 10 o 20. En algunas realizaciones, se lleva a cabo la infección a una MOI baja (por ejemplo, menos de 1). En el tiempo, las partículas de replicón pueden recogerse de las células empaquetadas infectadas con la solución madre de siembra. En algunas realizaciones, las partículas de replicón pueden a continuación pasarse a cultivos aún más grandes de células empaquetadas no expuestas a tratamiento anteriormente mediante infección de multiplicidad baja repetida, dando como resultado preparaciones a escala comercial con el mismo título alto.

55 **Composiciones de ácidos nucleicos**

Las moléculas de ácidos nucleicos recombinantes que codifican una o más proteínas o fragmentos de VRS pueden administrarse para inducir la producción de las proteínas o fragmentos de VRS codificados y una respuesta inmunitaria a los mismos. El ácido nucleico recombinante puede estar basado en cualquier ácido nucleico deseado tal como ADN (por ejemplo, ADN plásmido o vírico) o ARN, preferentemente, el ARN autorreplicante, y puede ser monocistrónico o policistrónico. Se puede usar cualquier ADN o ARN adecuado como el vector de ácido nucleico que transporta los

marcos de lectura abiertos que codifican las proteínas del VRS o los fragmentos de las mismas. Los vectores de ácidos nucleicos adecuados tienen la capacidad de transportar e impulsar la expresión de una o más proteínas o fragmentos de VRS. Dichos vectores de ácidos nucleicos se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, plásmidos, ADN obtenido de virus de ADN tales como vectores del virus vaccinia (por ejemplo, NYVAC, véase US 5.494.807), vectores de adenovirus, y vectores de del virus de la viruela (por ejemplo, vector del virus de la viruela del canario ALVAC, Sanofi Pasteur), y ARN obtenido de virus de ARN adecuados tales como alfavirus. Si se desea, la molécula de ácido nucleico recombinante puede modificarse, por ejemplo, para contener nucleobases y/o enlaces modificados, como se describe además en el presente documento.

Las moléculas de ácido nucleico recombinantes que son policistrónicas proporcionan la ventaja de liberar secuencias que codifican dos o más proteínas de VRS a una célula, y por ejemplo, impulsar la expresión de las proteínas VRS a niveles suficientes para dar como resultado la formación de un complejo de proteínas que contiene las dos o más proteínas de VRS *in vivo*. Usando esta estrategia, dos o más proteínas de VRS codificadas que forman un complejo pueden expresarse a niveles intracelulares suficientes para la formación de complejos de proteínas de VRS. Por ejemplo, Las proteínas de VRS codificadas o los fragmentos de las mismas pueden expresarse a prácticamente el mismo nivel, o, si se desea, a diferentes niveles seleccionando las secuencias de control de la expresión adecuadas (por ejemplo, promotores, IRES, sitio 2A, etc.). Esto es un modo significativamente más eficaz para producir complejos de proteínas *in vivo* que coadministrar dos o más moléculas de ADN individuales que codifican diferentes VRS en la misma célula, que puede ser ineficaz y muy variable. Véanse, por ejemplo, el documento WO 2004/076645.

Los ácidos nucleicos "autorreplicantes" descritos en el presente documento se denominan también por los inventores y en el presente documento como "autoamplificantes". Se pretende que los términos autorreplicante y autoamplificante tengan el mismo significado.

Las moléculas de ARN autorreplicante de la invención se basan en el ARN genómico de los virus de ARN, pero carecen de los genes que codifican una o más proteínas estructurales. Las moléculas de ARN autorreplicante son capaces de traducirse para producir proteínas no estructurales de virus de ARN y proteínas de VRS codificadas por el ARN autorreplicante.

El ARN autorreplicante contiene generalmente al menos uno o más genes seleccionados entre el grupo que consiste en la replicasa vírica, proteasas víricas, helicasas víricas y otras proteínas víricas no estructurales, y comprende también secuencias de replicación activas en cis en los extremos 5' y 3', y secuencias heterólogas que codifican una o más proteínas de VRS deseadas. Puede incluirse un promotor subgenómico que dirige la expresión de las secuencias heterólogas en el ARN autorreplicante. Si se desea, se puede fusionar una secuencia heteróloga en marco con otras regiones de codificación en el ARN AM-vac autorreplicante que puede estar bajo el control de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

Las moléculas de ARN autorreplicante de la invención pueden diseñarse de tal manera que la molécula de ARN autorreplicante no puede inducir la producción de partículas víricas infecciosas. Esto puede lograrse, por ejemplo, omitiendo uno o más genes víricos que codifican proteínas estructurales que son necesarias para la producción de partículas víricas en el ARN autorreplicante. Por ejemplo, cuando la molécula de ARN autorreplicante se basa en un alfavirus, tal como el virus Sindbis (SIN), el virus del bosque Semliki y virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEE), pueden omitirse uno o más genes que codifican proteínas estructurales víricas, tales como proteínas de la cápsida y/o la envoltura. Si se desea, se pueden diseñar las moléculas de ARN autorreplicante de la invención para inducir la producción de partículas víricas infecciosas que son atenuadas o virulentas, o para producir partículas víricas que son capaces de un único ciclo de infección posterior.

Una molécula de ARN autorreplicante puede, cuando se suministra a una célula de vertebrado, incluso sin ninguna proteína, conducir a la producción de múltiples ARN derivados mediante la transcripción de la misma (o de una copia de sentido contrario de la misma). El ARN autorreplicante puede traducirse directamente tras la administración a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que produce a continuación transcritos del ARN administrado. Por lo tanto, el ARN suministrado conduce a la producción de múltiples ARN derivados. Estos transcritos son de sentido contrario con respecto al ARN administrado y pueden traducirse por sí mismos para proporcionar la expresión *in situ* de la proteína de VRS codificada, o pueden transcribirse para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido que el ARN administrado que se traduce para proporcionar la expresión *in situ* de las proteínas de VRS codificadas.

Un sistema adecuado para conseguir la autorreplicación es utilizar un replicón de ARN basado en alfavirus, tal como el replicón de alfavirus que se describe en el presente documento. Estos replicones de hebras + se traducen después la administración a una célula para dar lugar a una replicasa (o replicasa-transcriptasa). La replicasa se traduce como una poliproteína que se autoescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias de hebras - genómicas del ARN administrado a la hebra +. Estos transcritos de hebras - pueden transcribirse ellos mismos para dar copias adicionales del ARN precursor de hebra + y también para dar un transcrito subgenómico que codifica dos o más proteínas de VRS. La traducción del transcrito subgenómico conduce, de este modo, a la expresión *in situ* de las proteínas de VRS por la célula infectada. Los replicones de alfavirus adecuados pueden usar una replicasa de un virus sindbis, un virus del bosque semliki, un virus de encefalitis equina oriental, un virus de encefalitis equina venezolana, etc.

Una molécula de ARN autorreplicante preferida codifica, de este modo, (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN de la molécula de ARN autorreplicante y (ii) una o más proteínas de VRS o fragmentos de las mismas. La polimerasa puede ser una replicasa de alfavirus, que comprende, por ejemplo, la proteína nsP4 de alfavirus.

- 5 Mientras que los genomas de alfavirus naturales codifican proteínas de virión estructurales además de la poliproteína de replicasa no estructural, se prefiere que una molécula de ARN autorreplicante basada en alfavirus de la invención no codifique todas las proteínas estructurales de alfavirus. Por tanto, el ARN autorreplicante puede conducir a la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no a la producción de viriones de alfavirus que contienen ARN. La incapacidad para producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus de tipo natural, la molécula de ARN autorreplicante no puede perpetuarse en forma infecciosa. Las proteínas estructurales del alfavirus que son necesarias para la perpetuación en los virus naturales están ausentes de los ARN autorreplicantes de la invención y su lugar está ocupado por el gen o los genes que codifican el producto génico deseado (proteína de VRS o fragmento de la misma), de modo que el transcrito subgenómico codifica el producto génico deseado en lugar de las proteínas estructurales del virión de alfavirus.
- 10
- 15 Por tanto, una molécula de ARN autorreplicante útil con la invención tiene una o más secuencias que codifican proteínas de VRS o fragmentos de las mismas. Las secuencias que codifican las proteínas o fragmentos de VRS pueden estar en cualquier orientación deseada, y pueden unirse operativamente a los mismo promotores o a promotores separados. Si se desea, las secuencias que codifican las proteínas o fragmentos de VRS pueden ser parte de un único marco de lectura abierto. En algunas realizaciones, el ARN puede tener una o más secuencias o marcos de lectura abiertos adicionales que codifican, por ejemplo otras proteínas de VRS adicionales o fragmentos de las mismas. Una molécula de ARN autorreplicante puede tener una secuencia de 5' que es compatible con la replicasa codificada.
- 20

En un aspecto, la molécula de ARN autorreplicante se deriva de, o está basada en un alfavirus, tal como el replicón de un alfavirus como se define en el presente documento. En otros aspectos, la molécula de ARN autorreplicante se deriva o está basada en un virus diferente de un alfavirus, preferentemente, un virus de ARN de hebra positiva, y más preferentemente un picornavirus, flavivirus, rubivirus, pestivirus, hepacivirus, calicivirus, o coronavirus. Las secuencias de alfavirus naturales adecuadas son bien conocidas y están disponibles de los depositarios de secuencias, tales como la American Type Culture Collection, Rockville, Md. Los ejemplos representativos de alfavirus adecuados incluyen Aura (ATCC VR-368), Virus Bebaru (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), Virus Chikungunya (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), Virus de la encefalitis equina oriental (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), Virus Getah (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylgach (ATCC VR-927), Virus Mayaro (ATCC VR-66; ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), Virus Mucambo (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), Virus Pixuna (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), Virus del río Ross (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Virus del bosque Semliki (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), Virus Sindbis (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Trinita (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), Virus de la encefalitis equina de Venezuela (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250, ATCC VR-1249, ATCC VR-532), Virus de la encefalomiелitis equina occidental (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926), e Y-62-33 (ATCC VR-375).

25

30

35

Las moléculas de ARN autorreplicante de la invención pueden contener uno o más nucleótidos modificados y por tanto tienen estabilidad mejorada y son resistentes a la degradación y al aclaramiento *in vivo*, y otras ventajas. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que las moléculas de ARN autorreplicante que contienen nucleótidos modificados evitan o reducen la estimulación de los receptores inmunitarios endosómicos y citoplásmicos cuando se administra el ARN autorreplicante en una célula. Esto permite que se produzca la autorreplicación, la amplificación y la expresión de la proteína. Esto reduce también los riesgos de seguridad con respecto al ARN autorreplicante que no contiene nucleótidos modificados, debido a que el ARN autorreplicante que contiene nucleótidos modificados reduce la activación del sistema inmunitario innato y posteriores consecuencias indeseadas (por ejemplo, inflamación en el sitio de inyección, irritación en el sitio de inyección, dolor, y similares). Se cree también que las moléculas de ARN producidas como resultado de la autorreplicación se reconocen como ácidos nucleicos extraños por los receptores inmunitarios citoplásmicos. Por lo tanto, las moléculas de ARN autorreplicante que contienen nucleótidos modificados proporcionan la amplificación eficaz del ARN en una célula hospedadora y la expresión de las proteínas gB de CMV, así como efectos adyuvantes.

40

45

50

Tal como se usa en el presente documento, "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que contiene una o más modificaciones químicas (por ejemplo, sustituciones) en o sobre la base nitrogenada del nucleósido (por ejemplo, citosina (C), timina (T) o uracilo (U)), adenina (A) o guanina (G)). Si se desea, una molécula de ARN autorreplicante puede contener modificaciones químicas en o sobre el resto azúcar del nucleósido (por ejemplo, ribosa, desoxirribosa, ribosa modificada, desoxirribosa modificada, un análogo de azúcar de seis miembros, o un análogo de azúcar de cadena abierta), o el fosfato.

55

Las moléculas de ARN autorreplicante pueden contener al menos un nucleótido modificado, que preferentemente, no es parte de la caperuza 5'. Por consiguiente, la molécula de ARN autorreplicante puede contener un nucleótido modificado en una única posición, puede contener un nucleótido modificado concreto (por ejemplo, pseudouridina, N6-metiladenosina, 5-metilcitosina, 5-metiluridina) en dos o más posiciones, o puede contener dos, tres, cuatro, cinco,

60

seis, siete, ocho, nueve, diez o más nucleótidos modificados (por ejemplo, cada uno en una o más posiciones). Preferentemente, las moléculas de ARN autorreplicantes comprenden nucleótidos modificados que contienen una modificación sobre o en la base nitrogenada, pero no contienen restos de azúcar o fosfato modificados.

5 En algunos ejemplos, entre 0,001 % y 99 % o 100 % de los nucleótidos en una molécula de ARN autorreplicante son nucleótidos modificados. Por ejemplo, 0,001 % - 25 %, 0,01 %-25 %, 0,1 %-25 %, o 1 %-25 % de los nucleótidos en una molécula de ARN autorreplicante son nucleótidos modificados.

10 En otros ejemplos, entre 0,001 % y 99 % o 100 % de un nucleótido sin modificar concreto en una molécula de ARN autorreplicante se sustituye con un nucleótido modificado. Por ejemplo, aproximadamente un 1 % de los nucleótidos en la molécula de ARN autorreplicante que contienen uridina pueden estar modificados, tal como mediante sustitución de la uridina con pseudouridina. En otros ejemplos, la cantidad deseada (porcentaje) de dos, tres, o cuatro nucleótidos concretos (nucleótidos que contienen uridina, citidina, guanosina, o adenina) en una molécula de ARN autorreplicante son nucleótidos modificados. Por ejemplo, 0,001 % - 25 %, 0,01 %-25 %, 0,1 %-25, o 1 %-25 % de un nucleótido concreto en una molécula de ARN autorreplicante son nucleótidos modificados. En otros ejemplos, 0,001 % - 20 %, 0,001 % - 15 %, 0,001 % - 10 %, 0,01 %-20 %, 0,01 %-15 %, 0,1 %-25 %, 0,01 %-10 %, 1 %-20 %, 1 %-15 %, 1 %-10 %, o aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 20 % de un nucleótido concreto en una molécula de ARN autorreplicante son nucleótidos modificados.

15 Se prefiere que menos del 100 % de los nucleótidos en una molécula de ARN autorreplicante sean nucleótidos modificados. Se prefiere también que menos del 100 % de un nucleótido concreto en una molécula de ARN autorreplicante sean nucleótidos modificados. Por lo tanto, las moléculas de ARN autorreplicante preferidas comprenden al menos algunos nucleótidos sin modificar.

20 Existen más de 96 modificaciones de nucleósidos que se producen naturalmente que se encuentran en el ARN de mamífero. Véanse, por ejemplo, Limbach y col., *Nucleic Acids Research*, 22(12):2183-2196 (1994). La preparación de nucleótidos y nucleósidos modificados es bien conocida en la técnica, por ejemplo, a partir de las patentes de Estados Unidos números 4373071, 4458066, 4500707, 4668777, 4973679, 5047524, 5132418, 5153319, 5262530, 5700642, y están comercialmente disponibles muchos nucleósidos modificados y nucleótidos modificados.

25 Las nucleobases modificadas que se pueden incorporar en nucleósidos modificados y nucleótidos modificados y están presentes en las moléculas de ARN autorreplicante incluyen m5C (5-metilcitidina), m5U (5-metiluridina), m6A (N6-metiladenosina), s2U (2-tiouridina), Um (2'-O-metiluridina), m1A (1-metiladenosina); m2A (2-metiladenosina); Am (2-1-0-metiladenosina); ms2m6A (2-metil-N6-metiladenosina); i6A (N6-isopenteniladenosina); ms2i6A (2-metil-N6isopenteniladenosina); io6A (N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); ms2io6A (2-metil-N6-(cis-hidroxiisopentenil) adenosina); g6A (N6-glicinilcarbamoiladenosina); t6A (N6-treonil carbamoiladenosina); ms2t6A (2-metil-N6-treonil carbamoiladenosina); m6t6A (N6-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina); hn6A(N6-hidroxinorvalilcarbamoil adenosina); ms2hn6A (2-metil-N6-hidroxinorvalil carbamoiladenosina); Ar(p) (2'-O-ribosiladenosina (fosfato)); I (inosina); m11 (1-metilinosina); m'lm (1,2'-O-dimetilinosina); m3C (3-metilcitidina); Cm (2T-O-metilcitidina); s2C (2-tiocitidina); ac4C (N4-acetilcitidina); f5C (5-fonnilcitidina); m5Cm (5,2-0-dimetil1citidina); ac4Cm(N4acetil2Tometilcitidina); k2C (lisidina); m1G (1-metilguanosina); m2G (N2-metilguanosina); m7G (7-metilguanosina); Gm (2'-O-metilguanosina); m22G (N2,N2-dimetilguanosina); m2Gm (N2,2'-O-dimetilguanosina); m22Gm (N2,N2,2'-O-trimetilguanosina); Gr(p) (2'-O-ribosilguanosina (fosfato)); yW (wibutosina); o2yW (peroxiwibutosina); OHyW (hidroxiwibutosina); OHyW* (hidroxiwibutosina sin modificar); imG (wiosina); mimG (metilguanosina); Q (queuosina); oQ (epoxiqueuosina); galQ (galactosil-queuosina); manQ (manosil-queuosina); preQo (7-ciano-7-desazaguanosina); preQi (7-aminometil-7-desazaguanosina); G (arcaeosina); D (dihidrouridina); m5Um (5,2'-O-dimetiluridina); s4U (4-tiouridina); m5s2U (5-metil-2-tiouridina); s2Um(2-tio-2'-O-metiluridina); acp3U (3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina); ho5U (5-hidroxiuridina); mo5U (5-metooxiuridina); cmo5U (ácido uridina 5-oxiacético); mcmo5U (éster metílico del ácido uridina 5-oxiacético); chm5U (5-(carboxihidroximetil)uridina)); mchm5U (5-(éster metílico de la carboxihidroximetil)uridina); mcm5U (5-metoxycarbonil metiluridina); mcm5Um(S-metoxycarbonilmetil-2-O-metiluridina); mcm5s2U (5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina); nm5s2U (5-aminometil-2-tiouridina); mnm5U (5-metilaminometiluridina); mnm5s2U (5-metilaminometil-2-tiouridina); mnm5se2U (5-metilaminometil-2-selenouridina); ncm5U (5-carbamoilmetil uridina); ncm5Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); cmnm5U (5-carboximetilaminometiluridina); cmnm5Um (5-carboximetilaminometil-2-L-Ometiluridina); cmnm5s2U (5-carboximetilaminometil-2-tiouridina); m62A (N6,N6-dimetiladenosina); Tm (2'-O-metilinosina); m4C (N4-metilcitidina); m4Cm (N4,2-O-dimetilcitidina); hm5C (5-hidroximetilcitidina); m3U (3-metiluridina); cm5U (5-carboximetiluridina); m6Am (N6,T-O-dimetiladenosina); rn62Am (N6,N6,O-2-trimetiladenosina); m2'7G (N2,7-dimetilguanosina); m2'2'7G (N2,N2,7-trimetilguanosina); m3Um (3,2T-O-dimetiluridina); m5D (5-metildihidrouridina); f5Cm (5-formil-2'-O-metilcitidina); m1Gm (1,2'-O-dimetilguanosina); m'Am (1,2-0-dimetil adenosina) irinometiluridina); tm5s2U (S-taurinometil-2-tiouridina)); imG-14 (4-desmetil guanosina); imG2 (isoguanosina); o ac6A (N6-acetiladenosina), hipoxantina, inosina, 8-oxo-adenina, derivados 7 sustituidos de los mismos, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-alquiluracilo (C₁-C₆), 5-metiluracilo, 5-alqueniluracilo (C₂-C₆), 5-alquiniluracilo (C₂-C₆), 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-alquilitosina (C₁-C₆), 5-metilcitosina, 5-alquenilcitosina (C₂-C₆), 5-alquinilcitosina (C₂-C₆), 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N²-dimetilguanina, 7-deazaguanina, 8-azaguanina, 7-desazaguanina 7-sustituida, 7-desaza-7-alquililguanina (C₂-C₆), 7-desazaguanina-8-sustituida, 8-hidroxiguanina, 6-tioguanina, 8-oxoguanina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, desazapurina 7 sustituida, 7-desazapurina 7 sustituida, 7-desazapurina-8-sustituida, e hidrógeno (resto abásico). m5C,

m5U, m6A, s2U, W, o 2'-O-metil-U. Una cualquiera o cualquier combinación de estas nucleobases modificadas puede incluirse en el ARN autorreplicante de la invención. Muchas de estas nucleobases modificadas y sus ribonucleósidos correspondientes están disponibles de suministradores comerciales.

5 Si se desea, la molécula de ARN autorreplicante puede contener enlaces de fosforamidato, fosforotioato, y/o metilfosfonato.

Las moléculas de ARN autorreplicante que comprenden al menos un nucleótido modificado pueden prepararse usando cualquier procedimiento adecuado. Se conocen en la técnica algunos procedimientos adecuados para producir moléculas de ARN que contienen nucleótidos modificados. Por ejemplo, se puede preparar una molécula de ARN autorreplicante que contiene nucleótidos modificados transcribiendo (por ejemplo, mediante transcripción (*in vitro*) un ADN que codifica la molécula de ARN autorreplicante usando una ARN polimerasa dependiente de ADN adecuada, tal como una ARN polimerasa del fago T7, ARN polimerasa del fago SP6, ARN polimerasa del fago T3, y similares, o mutantes de estas polimerasas que permiten la incorporación eficaz de los nucleótidos modificados en moléculas de ARN. La reacción de transcripción contendrá nucleótidos y nucleótidos modificados, y otros componentes que soportan la actividad de la polimerasa seleccionada, tales como un tampón adecuado, y las sales adecuadas. Puede diseñarse mediante ingeniería genética la incorporación de análogos de nucleótidos en un ARN autorreplicante, por ejemplo, para alterar la estabilidad de dichas moléculas de ARN, para aumentar la resistencia frente a la ARNasas, para establecer la replicación tras la introducción en células hospedadoras adecuadas ("infectividad" del ARN), y/o para inducir o reducir las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas.

Se pueden usar procedimientos sintéticos adecuados solos, o en combinación con uno o más procedimientos diferentes (por ejemplo, tecnología de ADN o ARN recombinante), para producir una molécula de ARN autorreplicante que contiene uno o más nucleótidos modificados. Son bien conocidos en la técnica los procedimientos adecuados para la síntesis de novo y se pueden adaptar para aplicaciones concretas. Los procedimientos ilustrativos incluyen, por ejemplo, la síntesis química usando grupos protectores adecuados tales como CEM (Masuda y col., (2007) Nucleic Acids Symposium Series 51:3-4), el procedimiento de la β -cianoetil fosforoamidita (Beaucage S L y col. (1981) Tetrahedron Lett 22:1859); el procedimiento del nucleósido de H-fosfonato (Garegg P y col. (1986) Tetrahedron Lett 27:4051-4; Froehler B C y col. (1986) Nucl Acid Res 14:5399-407; Garegg P y col. (1986) Tetrahedron Lett 27:4055-8; Gaffney B L y col. (1988) Tetrahedron Lett 29:2619-22). Estas químicas se pueden llevar a cabo o adaptarse para su uso con sintetizadores de ácidos nucleicos automatizados que están comercialmente disponibles. Se desvelan procedimientos sintéticos adicionales adecuados en Uhlmann y col. (1990) Chem Rev 90:544-84, y Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1: 165. Se puede llevar también a cabo la síntesis de ácidos nucleicos utilizando procedimientos recombinantes adecuados que son bien conocidos y convencionales en la técnica, incluyendo la clonación, el procesamiento, y/o la expresión de polinucleótidos y los productos génicos codificados por dichos polinucleótidos. La transposición del ADN mediante fragmentación aleatoria y el reensamblado de fragmentos génicos y polinucleótidos sintéticos mediante la PCR son ejemplos de técnicas conocidas que se pueden usar para diseñar y diseñar mediante ingeniería genética secuencias de polinucleótidos. Se puede usar la mutagénesis dirigida al sitio para alterar los ácidos nucleicos y las proteínas codificadas, por ejemplo, para insertar nuevos sitios de restricción, alterar los modelos de glicosilación, cambiar las preferencias del codón, producir variantes de corte y empalme, introducir mutaciones y similares. Se conocen procedimientos adecuados para la transcripción, traducción y expresión de las secuencias de ácidos nucleicos, y son convencionales en la técnica. (véase en general, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ed. Ausubel, y col., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13, 1988; Glover, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3, 1986; Bitter, y col., in Methods in Enzymology 153:516-544 (1987); The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Eds. Strathern y col., Cold Spring Harbor Press, Vols. I y II, 1982; y Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1989.)

La presencia y/o la cantidad de uno o más nucleótidos modificados en una molécula de ARN autorreplicante se puede determinar usando cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, un ARN autorreplicante puede digerirse a monofosfatos (por ejemplo, usando la nucleasa P1) y autofosforilarse (por ejemplo, usando una fosfatasa adecuada tal como CIAP) y analizarse los nucleósidos resultantes mediante HPLC en fase inversa (utilizando, por ejemplo una columna YMC Pack ODS-AQ (5 micrómetros, 4,6 X 250 M) y eluirse usando un gradiente, 30 % de B (0-5 min) a 100 % de B (5 - 13 min) y a 100 % de B (13-40) min, caudal (0,7 ml/min), detección UV (longitud de onda: 260 nm), temperatura de la columna (30 °C). Tampón A (ácido acético 20 mM - acetato de amonio pH 3,5), tampón B (ácido acético 20 M - acetato de amonio pH 3,5 / metanol [90/10])).

El ARN autorreplicante puede asociarse con un sistema de administración. El ARN autorreplicante puede administrarse con o sin un adyuvante.

Sistemas de administración de ARN

55 Los ARN autorreplicantes descritos en el presente documento son adecuados para administrarse en una variedad de modalidades, tales como la administración de ARN puro o en combinación con lípidos, polímeros u otros compuestos que facilitan la entrada en las células. Se pueden introducir moléculas de ARN autorreplicante en células o sujetos diana utilizando cualquier técnica adecuada, por ejemplo, mediante inyección directa, microinyección, electroporación, lipofección, biolística, y similares. La molécula de ARN autorreplicante puede también introducirse en células por medio de endocitosis mediada por el receptor. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.090.619; Wu y Wu, J.

Biol. Chem., 263:14621 (1988); y Curiel y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8850 (1991). Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.083.741 desvela introducir un ácido nucleico exógeno en células de mamífero asociando el ácido nucleico a un resto de poliacilación (por ejemplo, poli-L-lisina que tiene 3-100 restos de lisina (SEQ ID NO: 19)), que por sí mismo se acopla a un resto de unión al receptor de la integrina (por ejemplo, un péptido cíclico que tiene la secuencia Arg-Gly-Asp (SEQ ID NO:16)).

Las moléculas de ARN autorreplicantes pueden administrarse en células mediante anfifilos. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 6.071.890. Normalmente, un molécula de ácido nucleico puede formar un complejo con el anfifilo catiónico. Las células de mamífero que han entrado en contacto con el complejo pueden capturar fácilmente este.

- El ARN autorreplicante puede administrarse como ARN puro (por ejemplo, meramente como una solución acuosa de ARN) pero, para potenciar la entrada en las células y también los posteriores efectos intercelulares, el ARN autorreplicante se administra preferentemente en combinación con un sistema de administración, tal como un sistema de administración particulado o en emulsión. Un gran número de sistemas de administración son bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos sistemas de administración incluyen, por ejemplo, administración basada en liposomas (Debs y Zhu (1993) WO 93/24640; Mannino y Gould-Fogerite (1988) BioTechniques 6(7): 682-691; Rose U.S. Pat. n.º 5.279.833; Brigham (1991) WO 91/06309; y Felgner y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7414), así como el uso de vectores víricos por ejemplo, adenovíricos (véase, *por ejemplo*, Berns y col. (1995) Ann. NY Acad. Sci. 772: 95-104; Ali y col. (1994) Gene Ther. 1: 367-384; y Haddada y col. (1995) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199 (Pt 3): 297-306 para una revisión), papilomavíricos, retrovíricos (véanse, por ejemplo Buchscher y col. (1992) J. Virol. 66(5) 2731-2739; Johann y col. (1992) J. Virol. 66 (5): 1635-1640 (1992); Sommerfelt y col., (1990) Virol. 176:58-59; Wilson y col. (1989) J. Virol. 63:2374-2378; Miller y col., J. Virol. 65:2220-2224 (1991); Wong-Staal y col., PCT/US94/05700, y Rosenberg y Fauci (1993) en Fundamental Immunology, Tercera Edición Paul (ed) Raven Press, Ltd., Nueva York y las referencias del anterior, y Yu y col., Gene Therapy (1994) anteriormente.), y vectores víricos adenoasociados (véanse, West y col. (1987) Virology 160:38-47; Carter y col. (1989) patente de Estados Unidos n.º 4.797.368; Carter y col. documento WO 93/24641 (1993); Kotin (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Muzyczka (1994) J. Clin. Invest. 94:1351 y Samulski (posteriormente) para una revisión de los vectores adenovíricos; véase también, Lebkowski, patente de los Estados Unidos n.º 5.173.414; Tratschin y col. (1985) Mol. Cell. Biol. 5(11):3251-3260; Tratschin, y col. (1984) Mol. Cell. Biol., 4:2072-2081; Hermonat y Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466-6470; McLaughlin y col. (1988) y Samulski y col. (1989) J. Virol., 63:03822-3828), y similares.
- Tres sistemas de administración particularmente útiles son (i) liposomas, (ii) micropartículas de polímeros no tóxicos y biodegradables, y (iii) emulsiones de aceite en agua submicrónicas catiónicas.

Liposomas

Diversos lípidos anfifílicos pueden formar bicapas en un entorno acuoso para encapsular un núcleo acuoso que contiene un ARN como un liposoma. Estos lípidos pueden tener un grupo de cabeza aniónico, catiónico o de ion híbrido. La formación de liposomas a partir de fosfolípidos aniónicos data después de los años 60, y los lípidos formadores de liposomas catiónicos se han estudiado desde los años 90 del siglo XX. Algunos fosfolípidos son aniónicos mientras que otros son de iones híbridos. las clases adecuadas de fosfolípidos incluyen, aunque no de forma limitativa, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, y fosfatidilgliceroles. Los lípidos catiónicos útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, dioleoil trimetilamonio propano (DOTAP), 1,2-disteariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DODMA), 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLenDMA). Los lípidos de iones híbridos incluyen, aunque no de forma limitativa, lípidos de iones híbridos de acilo y lípidos de iones híbridos de éter. Los ejemplos de lípidos de iones híbridos útiles son DPPC, DOPC y dodecilsfosfolina. Los lípidos pueden estar saturados o insaturados.

- Los liposomas pueden formarse a partir de un único lípido o a partir de una mezcla de lípidos. Una mezcla puede comprender (i) una mezcla de lípidos aniónicos (ii) una mezcla de lípidos catiónicos (iii) una mezcla de lípidos de iones híbridos (iv) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos catiónicos (v) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos de iones híbridos (vi) una mezcla de lípidos de iones híbridos y lípidos catiónicos o (vii) una mezcla de lípidos aniónicos, lípidos catiónicos y lípidos de iones híbridos. De forma similar, una mezcla puede comprender lípidos saturados e insaturados. Por ejemplo, una mezcla puede comprender DSPC (de ion híbrido, saturados), DlinDMA (catiónico, insaturado), y/o DMPG (aniónico, saturado). Cuando se usa una mezcla de lípidos, no todos los lípidos componentes en la mezcla necesitan ser anfifílicos, por ejemplo, uno o más lípidos anfifílicos pueden mezclarse con colesterol.

La parte hidrófila de un lípido puede estar PEGilada (es decir, modificada por unión covalente de un polietilenglicol). Esta modificación puede aumentar la estabilidad y prevenir la adsorción no específica de los liposomas. Por ejemplo, se pueden conjugar los lípidos con PEG usando técnicas como las desveladas en Heyes y col. (2005) J Controlled Release 107:276-87.

Se puede usar una mezcla de DSPC, DlinDMA, PEG-DMPG y colesterol para formar liposomas. Un aspecto separado de la invención es un liposoma que comprende DSPC, DlinDMA, PEG-DMG y colesterol. Este liposoma encapsula preferentemente ARN, tal como un ARN autorreplicante, Por ejemplo, que codifica un inmunógeno.

Los liposomas se dividen usualmente en tres grupos: vesículas multilamelares (MLV); vesículas unilamelares pequeñas (SUV); y vesículas unilamelares grandes (LUV). Las MLV tienen múltiples bicapas en cada vesícula, formando algunos compartimentos acuosos separados. Las SUV y LUV tienen una única bicapa que encapsula un núcleo acuoso; Las SUV tienen normalmente un diámetro ≤ 50 nm, y las LUV tienen un diámetro >50 nm. Los liposomas útiles con la invención sin idealmente las LUV con un diámetro en el intervalo de 50-220 nm. Para una composición que comprende una población de LUV con diferentes diámetros: (i) al menos un 80 % en número debe tener diámetros en el intervalo de 20-220 nm, (ii) el diámetro promedio (Z_{av} , por intensidad) de la población está idealmente en el intervalo de 40-200 nm, y/o (iii) los diámetros deben tener un índice de polidispersidad $<0,2$.

Son bien conocidas en la materia las técnicas para preparar liposomas adecuados, por ejemplo, véanse Liposomes: Methods and Protocols, Volumen 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols. (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X; Liposome Technology, volúmenes I, II y III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006; y Functional Polymer Colloids and Microparticles volumen 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady y Guyot). Citus Books, 2002. Un procedimiento útil implica mezclar (i) una solución etanólica de los lípidos (ii) en una solución acuosa del ácido nucleico y (iii) tampón, seguido por mezcla, equilibrio, dilución y purificación (Heyes y col. (2005) J Controlled Release 107:276-87.).

El ARN se encapsula preferentemente en los liposomas, y por tanto, el liposoma forma una capa externa alrededor de un núcleo que contiene un solución acuosa de ARN. Se ha encontrado que esta encapsulación protege el ARN de la digestión de la ARNasa. Los liposomas pueden incluir algún ARN externo (por ejemplo, en la superficie de los liposomas), pero preferentemente, al menos la mitad del ARN (e idealmente prácticamente todo) está encapsulado.

20 **Micropartículas poliméricas**

Diversos polímeros pueden formar micropartículas para encapsular o adsorber ARN. El uso de un polímero sustancialmente no tóxico significa que el receptor puede recibir con seguridad las partículas, y el uso de un polímero biodegradable significa que las partículas pueden metabolizarse tras la administración para evitar la persistencia a largo plazo. Los polímeros útiles son también esterilizables, para ayudar en las preparaciones de calidad farmacéutica.

Los polímeros no tóxicos y biodegradables adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, poli(α -hidroxiácidos), ácidos polihidroxibutíricos, polilactonas (incluyendo policaprolactonas), polidioxanonas, polivalerolactonas, poliortoésteres, polianhídridos, policianoacrilatos, policarbonatos derivados de tirosina, polivinilpirrolidonas o poliesteramidas, y combinaciones de las mismas.

En algunas realizaciones, las micropartículas se forman a partir de poli(α -hidroxiácidos), tales como poli(láctidos) ("PLA"), copolímeros de láctido y glicólido tales como poli(D,L-láctido-co-glicólido) ("PLG"), y copolímeros de D,L-láctido y caprolactona. Los polímeros de PLG útiles incluyen aquellos que tienen una relación molar de láctido/glicólido que varía, por ejemplo, de 20:80 a 80:20, por ejemplo, 25:75, 40:60, 45:55, 55:45, 60:40, 75:25. Los polímeros de PLG útiles incluyen aquellos que tienen un peso molecular entre, por ejemplo, 5.000-200.000 Da, por ejemplo, entre 10.000-100.000, 20.000-70.000, 40.000-50.000 Da.

Las micropartículas tienen, idealmente un diámetro en el intervalo de 0,02 μm a 8 μm . para una composición que comprende una población de micropartículas con diferentes diámetros, al menos 80 % en número deben tener diámetros en el intervalo de 0,03-7 μm .

Son bien conocidas en la materia las técnicas para preparar micropartículas adecuadas, por ejemplo, véase Functional Polymer Colloids and Microparticles volumen 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady y Guyot). Citus Books, 2002; Polymers in Drug Delivery. (eds. Uchegbu & Schatzlein). CRC Press, 2006. (en particular el capítulo 7) y Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. (eds. Cohen & Bernstein). CRC Press, 1996. Para facilitar la adsorción del ARN, una micropartícula puede incluir un tensioactivo catiónico y/o un lípido, por ejemplo, como se desvela en O'Hagan y col. (2001) J Virology 75:9037-9043; y Singh y col. (2003) Pharmaceutical Research 20: 247-251. Un modo alternativo de preparar micropartículas poliméricas es mediante moldeo y curado, por ejemplo, como se desvela en el documento WO2009/132206.

Las micropartículas de la invención pueden tener un potencial zeta de entre 40-100 mV. El ARN puede absorberse en las micropartículas, y la absorción está facilitada por la inclusión de materiales catiónicos, (por ejemplo, lípidos catiónicos) en la micropartícula.

Emulsiones catiónicas de aceite en agua

Se conocen las emulsiones de aceite en agua por adyugar las vacunas de la gripe, por ejemplo, el adyuvante MF59TM en el producto FLUADTM, y el adyuvante AS03 en el producto PREPANDRIXTM. La administración del ARN puede llevarse a cabo con el uso de una emulsión de aceite en agua, con la condición de que la emulsión incluya una o más moléculas catiónicas. Por ejemplo, puede estar incluido un lípido catiónico en la emulsión para proporcionar una superficie de una gotícula cargada positivamente a la cual puede unirse el ARN cargado negativamente.

La emulsión comprende uno o más aceites. Los aceites adecuados incluyen aquellos procedentes, por ejemplo, de un animal (tal como un pescado) o una fuente vegetal. El aceite es idealmente biodegradable (metabolizable) y

biocompatible. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. Aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco, y aceite de oliva, el más comúnmente disponible, ilustra los aceites de nueces. Se puede usar el aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido del haba de jojoba. los aceites de semillas incluyen el aceite de cártamo, aceite de semillas de algodón, aceite de semillas de girasol, aceite de semillas de sésamo y similares. En el grupo de los aceites de grano, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero puede usarse también el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, tritical y similares. Los ésteres de ácidos grasos de 6-10 átomos de carbono de glicerol y 1,2-propanodilo, aunque no se producen naturalmente en los aceites de semillas, pueden prepararse mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales adecuados comenzando desde los aceites de nueces y semillas. Las grasas y aceites de la leche de mamífero se metabolizan y se pueden usar por tanto. Los procedimientos de separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros a partir de fuentes animales son bien conocidos en la técnica.

La mayoría del pescado contiene aceites metabolizables que se pueden recuperar fácilmente. Por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón, y el aceite de ballena tal como espermaceti ilustra algunos de los aceites de pescado que se pueden usar en el presente documento. Numerosos aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 átomos de carbono y se denominan generalmente como terpenoides. Se puede usar también el escualano, el análogo saturado del escualeno. Los aceites de pescado, incluyendo escualeno y escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Otros aceites útiles son los tocoferoles, particularmente en combinación con escualeno. Cuando la fase oleosa de una emulsión incluye un tocoferol, se puede usar cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ , pero se prefieren los tocoferoles α . Se pueden usar el D- α -tocoferol y el DL- α -tocoferol. Un α -tocoferol α es DL- α -tocoferol. Se puede usar una combinación de aceite que comprende escualeno y un tocoferol (por ejemplo, DL- α -tocoferol).

Las emulsiones preferidas comprenden escualeno, un aceite de hígado de tiburón que es un terpenoide insaturado ramificado ($C_{30}H_{50}$; $[(CH_3)_2C=CHCH_2CH_2C(CH_3)_2=CHCH_2]_2$; 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno; CAS RN 7683-64-9).

El aceite en la emulsión puede comprender una combinación de aceites, por ejemplo, escualeno y al menos un aceite adicional.

El componente acuoso de la emulsión puede ser agua corriente (por ejemplo, agua para inyección) o puede incluir componentes adicionales, por ejemplo, solutos. Por ejemplo, puede incluir sales para formar un tampón, por ejemplo, sales de citrato o fosfato, tales como sales de sodio. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina; o un tampón citrato. Se prefiere una fase acuosa tamponada, y los tampones se incluirán normalmente en el intervalo de 5-20 mM.

La emulsión incluye también un lípido catiónico. Preferentemente, este lípido es un tensioactivo de forma que puede facilitar la formación y estabilización de la emulsión. Los lípidos catiónicos útiles contienen generalmente un átomo de nitrógeno que está cargado positivamente en condiciones fisiológicas, por ejemplo, como una amina terciaria o cuaternaria. este nitrógeno puede estar en el grupo de cabeza hidrófilo de un tensioactivo anfifílico. Los lípidos catiónicos útiles incluyen, aunque no de forma limitativa: 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), 3'-[N-(N',N'-Dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol(DC Colesterol), dimetildioctadecil-amonio (DDA, por ejemplo, el bromuro), 1,2-Dimiristoil-3-trimetil-amonio propano (DMTAP), dipalmitoil(C16:0)trimetil amonio propano (DPTAP), diestearoiltrimetilamonio propano (DSTAP). Otros lípidos catiónicos útiles son: cloruro de benzalconio (BAK), cloruro de bencetonio, cetramida (que contiene bromuro de tetradeciltrimetilamonio y posiblemente, cantidades pequeñas de bromuro de dedeciltrimetilamonio y bromuro de hexadeciltrimetil amonio), cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de cetil trimetilamonio (CTCA), N,N',N'-polioxietileno (10)-N-sebo-1,3-diaminopropano, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, mezclado con bromuro de alquiltrimetilamonio, cloruro de bencildimetildodecilamonio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, metóxido de benciltrimetilamonio, bromuro de cetildimetiletilamonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), cloruro de metilbencetonio, cloruro de decametonio, cloruro de metilo mezclado con trialquilamonio, cloruro de metil trioctil amonio), cloruro de N,N-dimetil-N-[2(2-metil-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenoxi)-etoxi]etil]-bencenometanaminio (DEBDA), sales de dialquildimetilamonio, cloruro de [1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio, 1,2-diacil-3-(trimetilamonio) propano (grupo acilo=dimiristoilo, dipalmitoilo, distearoilo, dioleilo), 1,2-diacil-3 (dimetilamonio)propano (grupo acilo=dimiristoilo, dipalmitoilo, distearoilo, dioleilo), 1,2-dioleilo-3-(4'-trimetil-amonio)butanoilo-sn-glicerol, éster de 1,2-dioleilo 3-succinil-sn-glicerol colina, (4'-trimetilamonio) butanoato) de colesterilo, sales de N-alquiltridinio (por ejemplo, bromuro de cetilpiridinio y cloruro de cetilpiridinio), sales de N-alquelpiperidinio, electrolitos bolaformes dicatiónicos (C12Me6; C12BU6), dialquiliglicetilfosforilcolina, lisolecitina, L- α dioleoilfosfatidiletanolamina, éster de colesterol hemisuccinato de colina, lipopoliaminas, incluyendo aunque no de forma limitativa dioctadecilamidoglicilespermina (DOGS), dipalmitoil fosfatidiletanolamidoespermina (DPPEs), lipopoli-L (o D)-lisina (LPLL, LPDL), poli (L (o D)-lisina conjugada a N-glutarilfosfatidiletanolamina, éster de glutamato de didodecilo con un grupo amino pendiente ($C^{14}GluPhCnN$), éster de glutamato de ditradecilo con grupo amino pendiente ($C^{14}GluCnN+$), derivados catiónicos de colesterol, incluyendo, aunque no de forma limitativa la sal de colesteril-3 β -oxisuccinamidoetiltrimetilamonio, colesteril-3 β -oxisuccinamidoetilen-dimetilamina, sal de colesteril-3 β -carboxiamidoetiltrimetilamonio, y colesteril-3 β -carboxiamidoetilendimetilamina. Se describen otros lípidos catiónicos útiles en los documentos US 2008/0085870 y

US 2008/0057080. El lípido catiónico es preferentemente biodegradable (metabolizable) y biocompatible.

Además del aceite y el lípido catiónico, una emulsión puede incluir un tensioactivo no iónico y/o un tensioactivo de ion híbrido. Dichos tensioactivos incluyen, aunque no de forma limitativa: los tensioactivos ésteres de polioxietilensorbitán (denominados comúnmente como Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/u óxido de butileno (BO), comercializados con el nombre comercial DOWFAX™, tales como los copolímeros en bloque EO/PO lineales; octoxinoles, que pueden variar en el número de los grupos etoxi de repetición (oxi-1,2-etanodiilo), siendo de particular interés octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como tensioactivos Brij), tales como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); lauril éter polioxietileno 9; y ésteres de sorbitán (conocidos comúnmente como Spans), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son polisorbato 80 (Tween 80; monooleato de polioxietileno sorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Tritón X-100.

Se pueden incluir las mezclas de estos tensioactivos en la emulsión, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85, o mezclas de Tween 80/Triton-X100. Es también adecuada una combinación de un éster de polioxietileno sorbitán tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxi-polietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietileno sorbitán y/o un octoxinol. Las mezclas útiles pueden comprender un tensioactivo con un valor HLB en el intervalo de 10-20 (por ejemplo, polisorbato 80, con un HLB de 15,0) y un tensioactivo con un valor HLB en el intervalo de 1-10 (por ejemplo, trioleato de sorbitán, con un HLB de 1,8).

Las cantidades preferidas de aceite (% en volumen) en la emulsión final están entre 2-20 %, por ejemplo, 5-15 %, 6-14 %, 7-13 %, 8-12 %. Un contenido de escualeno de aproximadamente 4-6 % o aproximadamente 9-11 % es particularmente útil.

Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) en la emulsión final están entre 0,001 % y 8 %. Por ejemplo: ésteres de polioxietileno sorbitán (tales como polisorbato 80) 0,2 a 4 %, en particular entre 0,4-0,6 %, entre el 0,45-0,55 %, aproximadamente 0,5 % o entre 1,5-2 %, entre el 1,8-2,2 %, entre el 1,9-2,1 %, aproximadamente 2 %, o 0,85-0,95 %, o aproximadamente 1 %; ésteres de sorbitán (tales como trioleato de sorbitán) 0,02 a 2 %, en particular aproximadamente 0,5 % o aproximadamente 1 %; octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como Triton X-100) 0,001 a 0,1 %, en particular 0,005 a 0,02 %; éteres polioxietileno (tales como laureth 9) 0,1 a 8 %, preferentemente 0,1 a 10 % y en particular 0,1 a 1 % o aproximadamente 0,5 %.

Las cantidades absolutas de aceite y tensioactivo, y su relación, pueden variarse dentro de límites amplios aunque formando todavía una emulsión. Una persona experta puede variar fácilmente las proporciones relativas de los componentes para obtener una emulsión deseada, pero es típica una relación en peso de entre 4:1 y 5:1 para el aceite y el tensioactivo (aceite en exceso).

Un importante parámetro para asegurar la actividad inmunoestimuladora de una emulsión, particularmente en animales grandes, es el tamaño de la gotícula de aceite (diámetro). Las emulsiones más eficaces tienen un tamaño de la gotícula de aceite en el intervalo submicrométrico. De forma adecuada, los tamaños de las gotículas estarán en el intervalo de 50-750 nm. De forma más útil, el tamaño de gotícula promedio es menos de 250 nm, por ejemplo, menos de 200 nm, menos de 150 nm. El tamaño de gotícula promedio está, de forma útil en el intervalo de 80-180 nm. Idealmente, al menos un 80 % (en número) de las gotículas del aceite de la emulsión son menores de 250 nm de diámetro, y preferentemente al menos un 90 %. Los aparatos para determinar el tamaño de gotícula promedio en una emulsión, y la distribución de tamaños, están comercialmente disponibles. Estos usan normalmente las técnicas de dispersión de la luz dinámica y/o la detección óptica de partículas individuales, por ejemplo, mediante la serie de instrumentos Accusizer™ y Nicomp™ disponible de Particle Sizing Systems (Santa Barbara, USA), o los instrumentos Zetasizer™ de Malvern Instruments (Reino Unido) o los instrumentos del Analizador de la distribución del tamaño de partículas de Horiba (Kioto, Japón).

Idealmente, la distribución de los tamaños de gotículas (por el número) tiene solo un máximo, es decir, existe una única población de gotículas distribuida alrededor de un promedio (modo), más bien que teniendo dos máximos. Las emulsiones preferidas tienen una polidispersidad de <0,4, por ejemplo, 0,3, 0,2, o menos.

Las emulsiones adecuadas con gotículas submicrométricas y una distribución de tamaños estrecha pueden obtenerse mediante el uso de microfluidización. Esta técnica reduce el tamaño de gotícula de aceite promedio propulsando las corrientes de los elementos de entrada a través de canales geoméricamente fijos a alta presión y alta velocidad. Estas corrientes entran en contacto con las paredes de los canales, las paredes de la cámara y entre sí. Los resultados de las fuerzas de cizallamiento, impacto y cavitación producen una reducción en el tamaño de las gotículas. Se pueden llevar a cabo etapas repetidas de microfluidización hasta que se consigue una emulsión con un tamaño y una distribución de gotícula promedio deseado.

Como una alternativa a la microfluidización, se pueden usar procedimientos térmicos para producir una inversión de fase. Estos procedimientos pueden proporcionar también una emulsión submicrométrica con una distribución de

tamaño de partículas estrecha.

las emulsiones preferidas se pueden filtrar esterilizadas, es decir, sus gotículas pueden pasar a través de un filtro de 220 nm. Así como proporcionar una esterilización, este procedimiento también elimina cualquier gotícula grande en la emulsión.

5 En determinadas realizaciones, el lípido catiónico en la emulsión es DOTAP. La emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender entre aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml de DOTAP. Por ejemplo, la emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender DOTAP a entre aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0,7 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0,8 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0,9 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1,0 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1,1 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1,2 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1,3 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1,4 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1,5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1,6 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1,7 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 24 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 22 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 18 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 12 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 1,9 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 1,8 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 1,7 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml, de aproximadamente 0,7 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml, de aproximadamente 0,8 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 0,6 mg/ml, aproximadamente 0,7 mg/ml, aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,9 mg/ml, aproximadamente 1,0 mg/ml, aproximadamente 1,1 mg/ml, aproximadamente 1,2 mg/ml, aproximadamente 1,3 mg/ml, aproximadamente 1,4 mg/ml, aproximadamente 1,5 mg/ml, aproximadamente 1,6 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 21,8 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, etc. En una realización ilustrativa, la emulsión de aceite en agua catiónica comprende de aproximadamente 0,8 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml de DOTAP, tal como 0,8 mg/ml, 1,2 mg/ml, 1,4 mg/ml o 1,6 mg/ml.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico es colesterol DC. La emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender Colesterol DC a entre aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml de Colesterol DC. Por ejemplo, la emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender Colesterol DC entre aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,62 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2,46 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 3,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 4,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 4,92 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 4,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 3,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 2,46 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,62 mg/ml, aproximadamente 0,15 mg/ml, aproximadamente 0,3 mg/ml, aproximadamente 0,6 mg/ml, aproximadamente 0,62 mg/ml, aproximadamente 0,9 mg/ml, aproximadamente 1,2 mg/ml, aproximadamente 2,46 mg/ml, aproximadamente 4,92 mg/ml, etc. En una realización ilustrativa, la emulsión de aceite en agua catiónica comprende entre aproximadamente 0,62 mg/ml a aproximadamente 4,92 mg/ml de Colesterol DC, tal como 2,46 mg/ml.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico es DDA. La emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender entre aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml de DDA. Por ejemplo, la emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender DDA a entre aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 4,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 3,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 2,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1,45 mg/ml, de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,73 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,8 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,9 mg/ml a aproximadamente

5 mg/ml, de aproximadamente 1,0 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1,2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1,45 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 3,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 4,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 1,2 mg/ml, aproximadamente 1,45 mg/ml, etc. Como alternativa, la emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender DDA a aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 21,5 mg/ml, aproximadamente 21,6 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml. En una realización ilustrativa, la emulsión de aceite en agua catiónica comprende entre aproximadamente 0,73 mg/ml a aproximadamente 1,45 mg/ml de DDA, tal como 1,45 mg/ml.

Se pueden usar catéteres o dispositivos similares para administrar las moléculas de ARN autorreplicantes de la invención, como ARN puro o en combinación con un sistema de administración, en un órgano o tejido diana. Los catéteres adecuados se desvelan en, *por ejemplo*, las patentes de EE.UU. n.º 4.186.745; 5.397.307; 5.547.472; 5.674.192; y 6.129.705.

La presente invención incluye el uso de sistemas de administración adecuados, tales como liposomas, micropartículas poliméricas o micropartículas de emulsiones submicrométricas con ARN autorreplicante encapsulado o adsorbido, para administrar una molécula de ARN autorreplicante que codifica dos o más proteínas de VRS, por ejemplo, para estimular una única respuesta inmunitaria, o en combinación con otra macromolécula. La invención incluye liposomas, micropartículas y emulsiones submicrométricas con moléculas de ARN autorreplicante adsorbido y/o encapsulado, y combinaciones de las mismas.

Las moléculas de ARN autorreplicante asociadas con liposomas y micropartículas de emulsiones submicrométricas pueden administrarse eficazmente a una célula hospedadora, y pueden inducir una respuesta inmunitaria en la proteína codificada por el ARN autorreplicante.

Las moléculas de ARN autorreplicante policistrónicas que codifican la proteína VRS, y las VPR producidas utilizando replicones de alfavirus policistrónicos, se pueden usar para formar complejos de proteína VRS en una célula. En algunas realizaciones, las combinaciones de la VPR o las VPR que contienen secuencias que codifican dos o más proteínas o fragmentos de VRS se administran a una célula. En algunas realizaciones, las combinaciones de las moléculas de ARN autorreplicante o moléculas de ARN autorreplicante que codifican dos o más proteínas o fragmentos de VRS se administran a una célula.

30 **La composición inductora de la respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS**

Las composiciones inductoras de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS pueden comprender uno o más agentes inmunorreguladores. Preferentemente, uno o más de los agentes inmunorreguladores incluyen uno o más adyuvantes, por ejemplo dos, tres, cuatro o más adyuvantes. Los adyuvantes pueden incluir un adyuvante TH1 y/o un adyuvante TH2, descrito con más detalle más adelante.

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más transportadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo adyuvantes. Está disponible una exhaustiva descripción de dichos componentes en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472. Las composiciones estarán, generalmente, en forma acuosa.

La composición puede incluir conservantes, tales como timerosal o 2-fenoxietanol. Se prefiere, sin embargo, que la vacuna deba estar sustancialmente exenta (es decir, menos de 5 µg/ml) de material mercuríco, *por ejemplo*, exenta de tiomersal. Son más preferidas las composiciones inmunógenas que no contienen mercurio. Se prefieren particularmente las composiciones inmunógenas exentas de conservante.

Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente a entre 1 y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, fosfato disódico deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, y similares.

Las composiciones tendrán generalmente una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente, entre 240-360 mOsm/kg y más preferentemente, se encontrará en el intervalo de 290-310 mOsm/kg.

Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina (en particular, con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Los tampones se incluirán normalmente en el intervalo de 5-20 mM. El pH de la composición estará generalmente entre 5,0 y 8,1 y más normalmente entre 6,0 y 8,0, por ejemplo, entre 6,5 y 7,5, o entre 7,0 y 7,8. Un procedimiento de la invención puede por tanto incluir una etapa de ajustar el pH de la vacuna volumétrica antes del envasado.

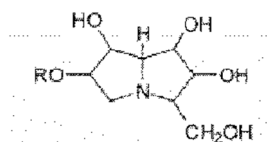
La composición es preferentemente estéril. La composición es preferentemente no pirógena, por ejemplo, conteniendo <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis, y preferentemente <0,1 UE por dosis. La composición

está preferentemente libre de gluten. Las vacunas para humanos se administran normalmente en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml, aunque puede administrarse media dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml) a niños.

Las composiciones de la invención, que contienen polipéptidos VRS-F, o ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de VRS-F, pueden incluir también uno o más adyuvantes, por ejemplo dos, tres, cuatro o más adyuvantes, que pueden funcionar para potenciar las respuestas inmunitarias (humoral y/o celular) estimuladas en un paciente que recibe la composición. Los adyuvantes pueden incluir un adyuvante TH1 y/o un adyuvante TH2. Los adyuvantes que pueden usarse en las composiciones de la invención incluyen, aunque no de forma limitativa:

- Las composiciones que contienen minerales. las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvante en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de calcio y sales de aluminio (o las mezclas de las mismas). La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc., o mezclas de diferentes compuestos minerales, con los compuestos que toman cualquier forma adecuada (por ejemplo, forma de gel, cristalina, amorfa, etc.), y prefiriéndose la adsorción. las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ejemplo, las partículas "CAP" desveladas en la patente de Estados Unidos n.º 6355271). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, y similares. Las composiciones que contienen minerales pueden formularse también como una partícula de una sal metálica (documento WO00/23105). Se describen con más detalle a continuación los adyuvantes de las sales de aluminio.
- Composiciones de emulsiones oleosas (véase con más detalle a continuación). Las composiciones de emulsiones oleosas adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (Escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span al 0,5 %, formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidizador).
- Agentes inductores de citoquinas (véase con más detalle a continuación). Los agentes inductores de citoquinas adecuados para su uso en la invención incluyen agonistas del receptor 7 de tipo toll (TLR7), (por ejemplo, los compuestos de benzonafitridina desvelados en el documento 2009/111337).
- Saponinas (capítulo 22 Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)), que son un grupo heterólogo de glicósidos de esteroides y glicósidos de triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies vegetales. Las saponinas de la corteza del árbol de la *Quillaia saponaria* Molina se han estudiado ampliamente como adyuvantes. La saponina puede obtenerse también comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo nupcial), y *Saponaria officinalis* (jabonera). Las formulaciones del adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOM. QS21 se comercializa como STIMULON (TM). Se han purificado las composiciones de saponina usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado las fracciones purificadas específicas que utilizan estas técnicas, que incluye QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la patente n.º 5.057.540. Las formulaciones de saponina pueden comprender también un esteroide, tal como colesterol (WO96/33739). Se pueden usar combinaciones de saponinas y esteroides para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (capítulo 23 de Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). Los ISCOM incluyen también normalmente un fosfolípido tal como una fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Se puede usar cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferentemente, los ISCOM incluyen uno o más de Quillaia, QHA y QHC. Los ISCOM se describen además en los documentos WO96/337391, EP-A-0109942 y WO96/11711. Opcionalmente, Los ISCOM pueden estar desprovistos de detergentes adicionales (documento WO00/07621). Se puede encontrar una revisión del desarrollo de los adyuvantes basados en saponina en Barr y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271 y Sjolander et y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.
- Adyuvantes grasos (véanse con más detalle a continuación), incluyendo emulsiones de aceite en agua, lípidos naturales modificados procedentes de lipopolisacáridos enterobacterianos, compuestos fosfolípidos (tales como el dímero del fosfolípido sintético, E6020) y similares.
- Toxinas bacterianas ribosilantes de ADP (por ejemplo, la enterotoxina "LT" térmicamente lábil de *E. coli*, toxina del coli "CT", o toxina pertussis "PT") y derivados detoxificados de las mismas, tales como las toxinas mutantes conocidas como LT-K63 y LT-R72 (Pizza y col. (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461). El uso de toxinas ribosilantes del ADP detoxificadas como adyuvantes mucosales se describe en el documento WO95/17211 y como adyuvantes parenterales en el documento WO98/42375.
- Bioadhesivos y mucoadhesivos, tales como microesferas de ácido hialurónico esterificadas (Singh y col (2001) J Cont Release 70:267-276) o quitosán y sus derivados (WO99/27960).
- Micropartículas es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferentemente, de ~200 nm a ~30 µm de diámetro o de ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, y similares), prefiriéndose el poli(láctido-co-glicólido), tratado opcionalmente para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).
- Liposomas (Capítulo 13 y 14 de Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). Los ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes se describen en la patente de Estados Unidos n.º 6.090.406, patente de Estados Unidos n.º 5.916.588 y EP-A-0626169.

- Éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno (documento WO99/52549). Dichas formulaciones incluyen tensioactivos de ésteres de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol (documento WO01/21207) así como éteres de polioxietileno alquilo o tensioactivos de ésteres en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol. Los éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan entre el siguiente grupo: lauril éter de polioxietileno-9 (laureth 9), esteoril éter de polioxietileno-9, polioxitileno-8-esteoril éter, lauril éter de polioxietileno 4, lauril éter de polioxietileno35, y lauril éter de polioxietileno 23.
- Péptidos de muramilo, tales como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr-MDP"), N -acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida ("DTP-DPP", o "Theramide™), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina ("MTP-PE").
- una preparación de proteosoma con una proteína de membrana externa preparada a partir de una primera bacteria Gram-negativa en combinación con una preparación de lipopolisacárido derivada de una segunda bacteria Gram-negativa, en la que el proteosoma con la proteína de membrana externa y las preparaciones de lipopolisacáridos forman un complejo adyuvante no covalente estable. Dichos complejos incluyen "IVX-908", un complejo comprendido por una membrana externa de *Neisseria meningitidis* y lipopolisacáridos.
- Un polímero de polioxidonio (Dyakonova y col. (2004) Int Immunopharmacol 4(13): 1615-23, FR-2859633) u otros derivados de polietileno-piperazina N-oxidada.
- 5'-monofosfato de metil inosina ("MIMP") (Signorelli & Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8):1177-86).
- Un compuesto de pirrolizidina polihidroxilado (documento WO2004/064715), tal como uno que tiene la fórmula:



donde R se selecciona entre el grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo, (por ejemplo cicloalquilo), alqueno, alquino y arilo lineales o ramificados, no sustituidos o sustituidos, saturados o insaturados o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa: casuarina, casuarina-6- α -D-glucopiranosil, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-*diepi*-casuarina, y similares

- un ligando CD1d, tal como un α -glicosilceramida (De Libero y col, (2005) Nature Reviews Immunology 5:485-496; Patente de Estados Unidos n.º 5.936.076; Old y col., J Clin Investig, 113:1631-1640; documento US2005/0192248; Yang y col. (2004) Angew Chem Int Ed 43:3818-3822; documento WO2005/102049; Goffet y col (2004) Am Chem Soc 126:13602-13603; documento WO03/105769) (por ejemplo, α -galactosilceramida), α -glicosilceramidas que contienen fitoesfingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanotriol], CRONY-101, 3"-O-sulfogalactosilceramida, etc.
- A gamma inulina (Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80) o un derivado de la misma, tal como algamulina.
- Virusomas y partículas similares a virus (VLP). Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas procedentes de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no patógenas, no replicantes y generalmente no contienen ninguno de los genomas víricos naturales. Las proteínas víricas pueden producirse de forma recombinante o aislarse de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para su uso en virusomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tales como HA o NA), virus de la hepatitis B (tal como las proteínas del núcleo o la cápsida), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, Virus Sindbis, Rotavirus, Virus de la enfermedad del pie y la boca, Retrovirus, Virus Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tales como el revestimiento de las proteínas), fago GA, fago fr, fago AP205, y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty).

Estas y otras sustancias activas adyuvantes se describen con más detalle en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) y Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de la serie Methods in Molecular Medicine). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.

Las composiciones pueden incluir dos, tres, cuatro o más adyuvantes. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden incluir de forma ventajosa una emulsión de aceite en agua y un agente inductor de la citoquina o una composición que contiene mineral y un agente inductor de las citoquinas, o dos adyuvantes de emulsiones de aceite en agua, o dos compuestos de benzonafitridina, etc.

Los antígenos y adyuvantes en una composición estarán normalmente en premezcla.

50 **Adyuvantes de emulsiones oleosas**

Las composiciones de emulsiones oleosas adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (Escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 %, y Span 85 al 0,5 %, formulados en partículas submicrométricas utilizando un microfluidizador). Se pueden utilizar también el adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA).

55 Se conocen varias emulsiones de aceite en agua, e incluyen normalmente al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo los aceites y los tensioactivos biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotículas de

aceite en la emulsión son generalmente menores de 5 µm de diámetro, y pueden incluso tener un diámetro submicrométrico, consiguiéndose estos tamaños pequeños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren las gotículas con un tamaño menor de 220 nm ya que pueden someterse a esterilización por filtración.

5 Se puede usar la invención con aceites tales como aquellos procedentes de una fuente animal (tal como un pescado) o una fuente vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. Aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco, y aceite de oliva, el más comúnmente disponible, ilustra los aceites de nueces. Se puede usar aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido de haba de jojoba. los aceites de semillas incluyen el aceite de cártamo, aceite de semillas de algodón, aceite de semillas de girasol, aceite de semillas de sésamo y similares. En el grupo de los
10 aceites de grano, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero puede usarse también el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, triticual y similares. Los ésteres de ácidos grasos de 6-10 átomos de carbono de glicerol y 1,2-propanodilo, aunque no se producen naturalmente en los aceites de semillas, pueden prepararse mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales adecuados comenzando desde los aceites de nueces y semillas. Las grasas y los aceites de la leche de mamíferos son metabolizables y se pueden
15 usar, por tanto, en la práctica de la presente invención. Los procedimientos de separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros a partir de fuentes animales son bien conocidos en la técnica. La mayoría del pescado contiene aceites metabolizables que se pueden recuperar fácilmente. Por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón, y el aceite de ballena tal como espermaceti ilustra algunos de los aceites de pescado que se pueden usar en el presente documento. Numerosos aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 átomos de carbono y se denominan generalmente como terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide insaturado ramificado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que se prefiere particularmente en el presente documento. El escualano, el análogo saturado de escualeno, es también un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluyendo escualeno y escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante
20 procedimientos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). Se pueden usar mezclas de aceites.

Los tensioactivos pueden clasificarse por su 'HLB' (balance hidrófilo/lipófilo. Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferentemente al menos 15, y más preferentemente al menos 16. la invención se puede usar con tensioactivos incluyendo, aunque no de forma limitativa: los tensioactivos ésteres de polioxietilensorbitán (denominados comúnmente como Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/u óxido de butileno (BO), comercializado con el nombre comercial DOWFAX (TM), tales como los copolímeros en bloque EO/PO lineales; octoxinoles, que pueden variar en el número de los grupos etoxi de repetición (oxi-1,2-etanodilo), siendo de particular interés octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como
30 fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tal como la serie TERGITOL (TM) NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleílo (conocidos como tensioactivos Brij), tales como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitán (conocidos comúnmente como SPANs), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Se prefieren los tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son TWEEN 80 (TM) (monooleato de polioxietileno sorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Tritón X-100.
40

Se pueden usar mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de TWEEN 80 (TM)/Span 85. Es también adecuada una combinación de un éster de polioxietileno sorbitán tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN 80(TM)) y un octoxinol tal como t-octilfenoxi-polietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietileno sorbitán y/o un octoxinol.

45 Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietileno sorbitán (tales como polisorbato 80(TM)) 0,01 a 1 %, en particular aproximadamente 0,1 %; octil o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como Triton X-100, u otros detergentes de la serie Triton) 0,001 a 0,1 %, en particular 0,005 a 0,02 %; éteres polioxietilenados (tales como laureth 9) 0,1 a 20 %, preferentemente 0,1 a 10 % y en particular 0,1 a 1 % o aproximadamente 0,5 %.

Los adyuvantes de emulsión de aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, aunque no de forma limitativa: una emulsión submicrométrica de escualeno, TWEEN 80 (TM), y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente escualeno al 5 %, aproximadamente, polisorbato 80 al 0,5 % y aproximadamente Span 85 al 0,5 %. En términos de peso, estas relaciones llegan a ser escualeno al 4,3 %, polisorbato 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,48 %. el presente adyuvante se conoce como 'MF59' (documentos WO90/14837; Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203; Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680), como se describe en más
55 detalle en el capítulo10 of Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) y el capítulo 12 de Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de la serie Methods in Molecular Medicine). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan. La emulsión de MF59 incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón citrato de sodio 10 M.

• Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y TWEEN 80 (TM). La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. Puede incluir también Span 85 (por ejemplo, al 1 %) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener de 2
60 a 10 % de escualeno, de 2 a 10 % de tocoferol y de 0,3 a 3 % de TWEEN 80 (TM), y la relación en peso de

escualeno:tocoferol es preferentemente <1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. Escualeno y TWEEN 80 (TM) pueden estar presentes en una relación volumétrica de aproximadamente 5:2. Una de dichas emulsiones puede prepararse disolviendo TWEEN 80 (TM) en PBS para dar una solución al 2 %, mezclando a continuación 90 ml de esta solución con una mezcla de (5g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), microfluidizando a continuación la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotículas de aceite submicrométricas, por ejemplo,

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente de Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véanse más adelante). La emulsión puede contener un tampón fosfato.
- Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente de Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación en masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 μ g/ml de polisorbato 80, 110 μ g/ml de Triton X-100 y 100 μ g/ml de succinato de α -tocoferol), y estas concentraciones deberán incluir cualquier contribución de estos componentes procedentes de los antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véanse más adelante). La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.
- Una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("PLURONIC (TM) L121"). La emulsión se puede formular en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para los dipéptidos de muramilo, y se ha utilizado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" (Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25) (Thr-MDP al 0,05-1 %, escualano al 5 %, Pluronic L121 al 2,5 % y polisorbato 80 al 0,2 %). También se puede usar sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" (Hariharan y col. (1995) Cancer Res 55:3486-9) (escualano al 5 %, Pluronic L121 al 1,25 % y polisorbato 80 al 0,2 %). Se prefiere la microfluidización.
- Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de alquil éter polioxietileno (por ejemplo, cetostearil éster polioxietileno (12) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitán o éster de manida, tal como monolaurato de sorbitán o 'Span 80'). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos un 90 % de las gotículas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquipoiglicósido. Dichas emulsiones pueden estar liofilizadas.
- Una emulsión que tiene un 0,5-50 % de un aceite, 0,1-10 % de un fosfolípido, y 0,05-5 % de un tensioactivo no iónico. Como se ha descrito en la referencia WO95/11700, los componentes de fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Las gotículas de tamaño submicrométrico son ventajosas.
- Una emulsión submicrométrica de aceite en agua de un aceite no metabolizable (tal como un aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, TWEEN 80 (TM) o Span 80). Se pueden incluir aditivos, tales como saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófico (tal como GPI-0100, descrito en la patente de Estados Unidos n.º 6.080.725, producida por adición de una amina alifática la desacilsaponina mediante el grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxietil)propanodiamina.
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico, y un tensioactivo no iónico hidrófilo (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno).
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, y un tensioactivo no iónico hidrófilo (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno).
- Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroles (por ejemplo, un colesterol) se asocian como micelas helicoidales (documento WO2005/097181).

Las emulsiones se pueden mezclar con antígeno extemporáneamente, en el momento de la administración. De esta forma, el adyuvante y el antígeno se pueden mantener por separado en un envase o vacuna distribuida, listos para la formulación final en el momento del uso. El antígeno estará, generalmente, en forma acuosa, de forma que la vacuna se prepara finalmente por mezclado de dos líquidos. La relación de volumen de los dos líquidos a mezclar puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5) pero es generalmente de aproximadamente 1:1.

Agentes inductores de citoquinas

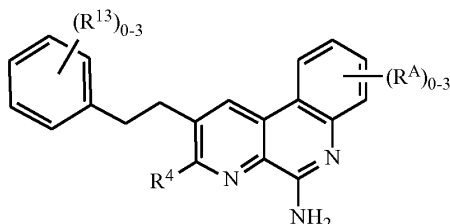
Los agentes inductores de citoquinas para su inclusión en las composiciones de la invención son capaces, cuando se administran a un paciente, de estimular al sistema inmunitario para que libere citoquinas, incluidos los interferones y las interleuquinas. Los agentes preferidos pueden inducir la liberación de uno o más de: interferón- γ ; interleuquina-1; interleuquina-2; interleuquina-12; TNF- α ; TNF- β ; y GM-CSF. Los agentes preferidos que estimulan la liberación de citoquinas asociadas con una respuesta inmunitaria de tipo Th1, *por ejemplo*, interferón- γ , TNF- α , interleuquina-2. Se prefiere la estimulación tanto de interferón- γ como interleuquina-2.

Como resultado de recibir una composición de la invención, por lo tanto, un paciente puede tener linfocitos T que, cuando se estimulan con una proteína VRS F, liberarán la una o más citoquinas deseadas de una forma específica del antígeno. Por ejemplo, Los linfocitos T purificados de su sangre liberarán γ -interferón cuando se exponen *in vitro* a la proteína F. Los procedimientos para medir dichas respuestas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se conocen en la técnica, e incluyen ELISA, ELISPOT, citometría de flujo y PCR en tiempo real. Por ejemplo,

Tassignon y col. (2005) J Immunol Meth 305:188-98 informan de un estudio en el que las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T específicos de antígeno contra el toxoide tetánico, específicamente, las respuestas de γ -interferón, fueron objeto de seguimiento, y se descubrió que el ELISPOT era el procedimiento más sensible para discriminar las respuestas inducidas por linfocitos T específicos de antígeno de las respuestas espontáneas, pero que la detección de la citoquina intracitoplásmica mediante citometría de flujo era el procedimiento más eficaz para detectar los efectos de reestimulación.

Los agentes inductores de citoquinas adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa:

- un oligonucleótido inmunoestimulador, tal como uno que contenga un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina no metilada unida mediante un enlace fosfato a una guanosina) o un ARN bicatenario, o un oligonucleótido que contiene una secuencia palindrómica, o un oligonucleótido que contiene una secuencia poli(dG).
- Monofosforil lípido A 3-O-desacilado ('3dMPL', también conocido como "MPL (TM)") (Myers y col. (1990) páginas 145-156 de Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions; Ulrich (2000) Capítulo 16 (páginas 273-282) de Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de la serie Methods in Molecular Medicine). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan; Johnson y col. (1999) J Med Chem 42:4640-9; Baldrick y col. (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413).
- Un compuesto de imidazoquinolina, tal como IMIQUIMOD (TM) ("R-837") (patente de Estados Unidos n.º 4.680.338, patente de Estados Unidos n.º 4.988.815), RESIQUIMOD (TM) ("R-848") (WO92/15582), y sus análogos; y sales de los mismos (por ejemplo, sales de clorhidrato). Otros detalles relativos a las imidazoquinolinas inmunoestimuladoras se pueden encontrar en Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:57 1-577; Wu y col. (2004) Antiviral Res. 64 (2): 79-83; Vasilakos y col. (2000) Cell Immunol. 204 (1): 64-74; patentes de Estados Unidos números 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6664264, 6664265, 6667312, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000, y 6924293; y Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.
- Un compuesto de benzonafitridina, tales como: (a) un compuesto que tiene la fórmula:



en la que:

R^4 se selecciona entre H, halógeno, $-C(O)OR^7$, $-C(O)R^7$, $-C(O)N(R^{11}R^{12})$, $-N(R^{11}R^{12})$, $-N(R^9)_2$, $-NHN(R^9)_2$, $-SR^7$, $-(CH_2)_nOR^7$, $-(CH_2)_nR^7$, $-LR^8$, $-LR^{10}$, $-OLR^8$, $-OLR^{10}$, alquilo C_1-C_6 , heteroalquilo C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_8 , alquino C_2-C_8 , alcoxi C_1-C_6 , haloalcoxi C_1-C_6 , arilo, heteroarilo, cicloalquilo C_3-C_8 , y heterocicloalquilo C_3-C_8 , en la que los grupos alquilo C_1-C_6 heteroalquilo C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_8 , alquino C_2-C_8 , alcoxi C_1-C_6 , haloalcoxi C_1-C_6 arilo, heteroarilo, cicloalquilo C_3-C_8 , y heterocicloalquilo C_3-C_8 de R^4 están cada uno de ellos opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, $-CN$, $-NO_2$, $-R^7$, $-OR^8$, $-C(O)R^8$, $-OC(O)R^8$, $-C(O)OR^8$, $-N(R^9)_2$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$, $-OP(O)(OR^{10})_2$, $-C(O)N(R^9)_2$, $-S(O)_2R^8$, $-S(O)R^8$, $-S(O)_2N(R^9)_2$, y $-NR^9S(O)_2R^8$;

cada L se selecciona independientemente entre un enlace, $-(O(CH_2)_m)_r$, alquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_6 y alquinileno C_2-C_6 , en la que dicho alquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_6 y alquinileno C_2-C_6 de L están cada uno de ellos opcionalmente sustituidos con de 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, $-R^8$, $-OR^8$, $-N(R^9)_2$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$, y $-OP(O)(OR^{10})_2$;

R^7 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_6 , arilo, heteroarilo, cicloalquilo C_3-C_8 , heteroalquilo C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_8 , alquino C_2-C_8 , alcoxi C_1-C_6 , haloalcoxi C_1-C_6 , y heterocicloalquilo C_3-C_8 , en la que los grupos alquilo C_1-C_6 arilo, heteroarilo, cicloalquilo C_3-C_8 , heteroalquilo C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_8 , alquino C_2-C_8 , alcoxi C_1-C_6 , haloalcoxi C_1-C_6 y heterocicloalquilo C_3-C_8 de R^7 están cada uno de ellos opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 grupos R^{13} ; cada R^8 se selecciona independientemente entre H, $-CH(R^{10})_2$, alquilo C_1-C_8 , alqueno C_2-C_8 , alquino C_2-C_8 , haloalquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , heteroalquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_8 , heterocicloalquilo C_2-C_8 , hidroxialquilo C_1-C_6 y haloalcoxi C_1-C_6 , en la que los grupos alquilo C_1-C_8 alqueno C_2-C_8 , alquino C_2-C_8 , heteroalquilo C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_8 , heterocicloalquilo C_2-C_8 , hidroxialquilo C_1-C_6 y haloalcoxi C_1-C_6 de R^8 están cada uno de ellos opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre $-CN$, R^{11} , $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, $-C(O)R^{11}$, $-OC(O)R^{11}$, $-C(O)N(R^9)_2$, $-C(O)OR^{11}$, $-NR^9C(O)R^{11}$, $-NR^9R^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-N(R^9)_2$, $-OR^9$, $-OR^{10}$, $-C(O)NR^{11}R^{12}$, $-C(O)NR^{11}OH$, $-S(O)_2R^{11}$, $-S(O)R^{11}$, $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$, $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$, $-P(O)(OR^{11})_2$, y $-OP(O)(OR^{11})_2$;

cada R^9 se selecciona independientemente entre H, $-C(O)R^8$, $-C(O)OR^8$, $-C(O)R^{10}$, $-C(O)OR^{10}$, $-S(O)_2R^{10}$, $-$

alquilo C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆ y cicloalquilo C₃-C₆, o cada R⁹ es independientemente un alquilo C₁-C₆ que junto con el N al que están unidos forman un heterocicloalquilo C₃-C₈, en la que el anillo de heterocicloalquilo C₃-C₈ contiene opcionalmente un heteroátomo opcional seleccionado entre N, O y S, y en la que los grupos alquilo C₁-C₆ heteroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆ o heterocicloalquilo C₃-C₈ de R⁹ están cada uno de ellos

opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre -CN, R¹¹, -OR¹¹, -SR¹¹, -C(O)R¹¹, -OC(O)R¹¹, -C(O)OR¹¹, -NR¹¹R¹², -C(O)NR¹¹R¹², -C(O)NR¹¹OH, -S(O)₂R¹¹, -S(O)R¹¹, -S(O)₂NR¹¹R¹², -NR¹¹S(O)₂R¹¹, -P(O)(OR¹¹)₂, y -OP(O)(OR¹¹)₂;

cada R¹⁰ se selecciona independientemente entre arilo, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo C₃-C₈ y heteroarilo, en la que los grupos arilo, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo C₃-C₈ y heteroarilo están

opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados entre halógeno, -R⁸, -OR⁸, -LR⁹, -LOR⁹, -N(R⁹)₂, -NR⁹C(O)R⁸, -NR⁹CO₂R⁸, -CO₂R⁸, -C(O)R⁸ y -C(O)N(R⁹)₂;

R¹¹ y R¹² se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈, y heterocicloalquilo C₃-C₈, en la que los grupos alquilo C₁-C₆ heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈, y heterocicloalquilo C₃-C₈ de R¹¹ y R¹² están cada uno de ellos

opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, -CN, R⁸, -OR⁸, -C(O)R⁸, -OC(O)R⁸, -C(O)OR⁸, -N(R⁹)₂, -NR⁸C(O)R⁸, -NR⁸C(O)OR⁸, -C(O)N(R⁹)₂, heterocicloalquilo C₃-C₈, -S(O)₂R⁸, -S(O)₂N(R⁹)₂, -NR⁹S(O)₂R⁸, haloalquilo C₁-C₆ y haloalcoxi C₁-C₆;

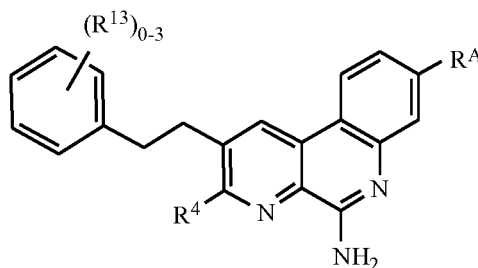
o R¹¹ y R¹² son cada uno de ellos independientemente alquilo C₁-C₆ y tomados junto con el átomo de N al que están unidos forman un anillo de heterocicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido que contiene un heteroátomo adicional seleccionado entre N, O y S;

cada R¹³ se selecciona independientemente entre halógeno, -CN, -LR⁹, -LOR⁹, -OLR⁹, -LR¹⁰, -LOR¹⁰, -OLR¹⁰, -LR⁸, -LOR⁸, -OLR⁸, -LSR⁸, -LSR¹⁰, -LC(O)R⁸, -OLC(O)R⁸, -LC(O)OR⁸, -LC(O)R¹⁰, -LOC(O)OR⁸, -LC(O)NR⁹R¹¹, -LC(O)NR⁹R⁸, -LN(R⁹)₂, -LNR⁹R⁸, -LNR⁹R¹⁰, -LC(O)N(R⁹)₂, -LS(O)₂R⁸, -LS(O)R⁸, -LC(O)NR⁸OH, -LNR⁹C(O)R⁸, -LNR⁹C(O)OR⁸, -LS(O)₂N(R⁹)₂, -OLS(O)₂N(R⁹)₂, -LNR⁹S(O)₂R⁸, -LC(O)NR⁹LN(R⁹)₂, -LP(O)(OR⁸)₂, -LOP(O)(OR⁸)₂, -LP(O)(OR¹⁰)₂ y -OLP(O)(OR¹⁰)₂;

cada R^A se selecciona, independientemente entre -R⁸, -R⁷, -OR⁷, -OR⁸, -R¹⁰, -OR¹⁰, -SR⁸, -NO₂, -CN, -N(R⁹)₂, -NR⁹C(O)R⁸, -NR⁹C(S)R⁸, -NR⁹C(O)N(R⁹)₂, -NR⁹C(S)N(R⁹)₂, -NR⁹CO₂R⁸, -NR⁹NR⁹C(O)R⁸, -NR⁹NR⁹C(O)N(R⁹)₂, -NR⁹NR⁹CO₂R⁸, -C(O)C(O)R⁸, -C(O)CH₂C(O)R⁸, -CO₂R⁸, -(CH₂)₂CO₂R⁸, -C(O)R⁸, -C(S)R⁸, -C(O)N(R⁹)₂, -C(S)N(R⁹)₂, -OC(O)N(R⁹)₂, -OC(O)R⁸, -C(O)N(OR⁸)R⁸, -C(NOR⁸)R⁸, -S(O)₂R⁸, -S(O)₃R⁸, -SO₂N(R⁹)₂, -S(O)R⁸, -NR⁹SO₂N(R⁹)₂, -NR⁹SO₂R⁸, -P(O)(OR⁸)₂, -OP(O)(OR⁸)₂, -P(O)(OR¹⁰)₂, -OP(O)(OR¹⁰)₂, -N(OR⁸)R⁸, -CH=CHCO₂R⁸, -C(=NH)-N(R⁹)₂, y -(CH₂)_nNHC(O)R⁸; o dos sustituyentes R^A adyacentes en el Anillo A forman un anillo de 5-6 miembros que contiene hasta dos heteroátomos como miembros del anillo;

n es, independientemente en cada caso, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; cada m se selecciona, independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y

t es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; (b) un compuesto que tiene la fórmula:



en la que:

R⁴ se selecciona entre H, halógeno, -C(O)OR⁷, -C(O)R⁷, -C(O)N(R¹¹R¹²), -N(R¹¹R¹²), -N(R⁹)₂, -NHN(R⁹)₂, -SR⁷, -(CH₂)_nOR⁷, -(CH₂)_nR⁷, -LR⁸, -LR¹⁰, -OLR⁸, -OLR¹⁰, alquilo C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, alcoxi C₁-C₆, haloalcoxi C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈, y heterocicloalquilo C₃-C₈, en la que los grupos alquilo C₁-C₆ heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, alcoxi C₁-C₆, haloalcoxi C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈, y heterocicloalquilo C₃-C₈ de R⁴ están cada uno de ellos opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, -CN, -NO₂, -R⁷, -OR⁸, -C(O)R⁸, -OC(O)R⁸, -C(O)OR⁸, -N(R⁹)₂, -P(O)(OR⁸)₂, -OP(O)(OR⁸)₂, -P(O)(OR¹⁰)₂, -OP(O)(OR¹⁰)₂, -C(O)N(R⁹)₂, -S(O)₂R⁸, -S(O)R⁸, -S(O)₂N(R⁹)₂, y -NR⁹S(O)₂R⁸;

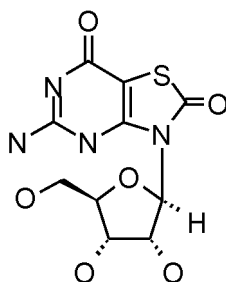
cada L se selecciona independientemente entre un enlace, -(O(CH₂)_m)-, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆ y alquinieno C₂-C₆, en la que dicho alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆ y alquinieno C₂-C₆ de L están cada uno de ellos opcionalmente sustituidos con de 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, -R⁸, -OR⁸, -N(R⁹)₂, -P(O)(OR⁸)₂, -OP(O)(OR⁸)₂, -P(O)(OR¹⁰)₂, y -OP(O)(OR¹⁰)₂;

R⁷ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, alcoxi C₁-C₆, haloalcoxi C₁-C₆, y heterocicloalquilo C₃-C₈, en la que los grupos alquilo C₁-C₆ arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₈, alquino

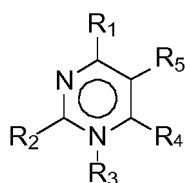
C₂-C₈, alcoxi C₁-C₆, haloalcoxi C₁-C₆ y heterocicloalquilo C₃-C₈ de R⁷ están cada uno de ellos opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 grupos R¹³; cada R⁸ se selecciona independientemente entre H, -CH(R¹⁰)₂, alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, haloalquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo C₂-C₈, hidroxialquilo C₁-C₆ y haloalcoxi C₁-C₆), en la que los grupos alquilo C₁-C₈ alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo C₂-C₈, hidroxialquilo C₁-C₆ y haloalcoxi C₁-C₆ de R⁸ están cada uno de ellos opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre -CN, R¹¹, -OR¹¹, -SR¹¹, -C(O)R¹¹, -OC(O)R¹¹, -C(O)N(R⁹)₂, -C(O)OR¹¹, -NR⁹C(O)R¹¹, -NR⁹R¹⁰, -NR¹¹R¹², -N(R⁹)₂, -OR⁹, -OR¹⁰, -C(O)NR¹¹R¹², -C(O)NR¹¹OH, -S(O)₂R¹¹, -S(O)R¹¹, -S(O)₂NR¹¹R¹², -NR¹¹S(O)₂R¹¹, -P(O)(OR¹¹)₂, y -OP(O)(OR¹¹)₂; cada R⁹ se selecciona independientemente entre H, -C(O)R⁸, -C(O)OR⁸, -C(O)R¹⁰, -C(O)OR¹⁰, -S(O)₂R¹⁰, alquilo C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆ y cicloalquilo C₃-C₆, o cada R⁹ es independientemente un alquilo C₁-C₆ que junto con el N al que están unidos forman un heterocicloalquilo C₃-C₈, en la que el anillo de heterocicloalquilo C₃-C₈ contiene opcionalmente un heteroátomo opcional seleccionado entre N, O y S, y en la que los grupos alquilo C₁-C₆ heteroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆ o heterocicloalquilo C₃-C₈ de R⁹ están cada uno de ellos opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre -CN, R¹¹, -OR¹¹, -SR¹¹, -C(O)R¹¹, -OC(O)R¹¹, -C(O)OR¹¹, -NR¹¹R¹², -C(O)NR¹¹R¹², -C(O)NR¹¹OH, -S(O)₂R¹¹, -S(O)R¹¹, -S(O)₂NR¹¹R¹², -NR¹¹S(O)₂R¹¹, -P(O)(OR¹¹)₂, y -OP(O)(OR¹¹)₂; cada R¹⁰ se selecciona independientemente entre arilo, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo C₃-C₈ y heteroarilo, en la que los grupos arilo, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo C₃-C₈ y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados entre halógeno, -R⁸, -OR⁸, -LR⁹, -LOR⁹, -N(R⁹)₂, -NR⁹C(O)R⁸, -NR⁹CO₂R⁸, -CO₂R⁸, -C(O)R⁸ y -C(O)N(R⁹)₂; R¹¹ y R¹² se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈, y heterocicloalquilo C₃-C₈, en la que los grupos alquilo C₁-C₆ heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈, y heterocicloalquilo C₃-C₈ de R¹¹ y R¹² están cada uno de ellos opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, -CN, R⁸, -OR⁸, -C(O)R⁸, -OC(O)R⁸, -C(O)OR⁸, -N(R⁹)₂, -NR⁸C(O)R⁸, -NR⁸C(O)OR⁸, -C(O)N(R⁹)₂, heterocicloalquilo C₃-C₈, -S(O)₂R⁸, -S(O)₂N(R⁹)₂, -NR⁸S(O)₂R⁸, haloalquilo C₁-C₆ y haloalcoxi C₁-C₆; o R¹¹ y R¹² son cada uno de ellos independientemente alquilo C₁-C₆ y tomados junto con el átomo de N al que están unidos forman un anillo de heterocicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido que contiene un heteroátomo adicional seleccionado entre N, O y S; cada R¹³ se selecciona independientemente entre halógeno, -CN, -LR⁹, -LOR⁹, -OLR⁹, -LR¹⁰, -LOR¹⁰, -OLR¹⁰, -LR⁸, -LOR⁸, -OLR⁸, -LSR⁸, -LSR¹⁰, -LC(O)R⁸, -OLC(O)R⁸, -LC(O)OR⁸, -LC(O)R¹⁰, -LOC(O)OR⁸, -LC(O)NR⁹R¹¹, -LC(O)NR⁹R⁸, -LN(R⁹)₂, -LNR⁹R⁸, -LNR⁹R¹⁰, -LC(O)N(R⁹)₂, -LS(O)₂R⁸, -LS(O)R⁸, -LC(O)NR⁸OH, -LNR⁹C(O)R⁸, -LNR⁹C(O)OR⁸, -LS(O)₂N(R⁹)₂, -OLS(O)₂N(R⁹)₂, -LNR⁹S(O)₂R⁸, -LC(O)NR⁹LN(R⁹)₂, -LP(O)(OR⁸)₂, -LOP(O)(OR⁸)₂, -LP(O)(OR¹⁰)₂ y -OLP(O)(OR¹⁰)₂; cada R^A se selecciona, independientemente entre -R⁸, -R⁷, -OR⁷, -OR⁸, -R¹⁰, -OR¹⁰, -SR⁸, -NO₂, -CN, -N(R⁹)₂, -NR⁹C(O)R⁸, -NR⁹C(S)R⁸, -NR⁹C(O)N(R⁹)₂, -NR⁹C(S)N(R⁹)₂, -NR⁹CO₂R⁸, -NR⁹NR⁹C(O)R⁸, -NR⁹NR⁹C(O)N(R⁹)₂, -NR⁹NR⁹CO₂R⁸, -C(O)C(O)R⁸, -C(O)CH₂C(O)R⁸, -CO₂R⁸, -(CH₂)_nCO₂R⁸, -C(O)R⁸, -C(S)R⁸, -C(O)N(R⁹)₂, -C(S)N(R⁹)₂, -OC(O)N(R⁹)₂, -OC(O)R⁸, -C(O)N(OR⁸)R⁸, -C(NOR⁸)R⁸, -S(O)₂R⁸, -S(O)₃R⁸, -SO₂N(R⁹)₂, -S(O)R⁸, -NR⁹SO₂N(R⁹)₂, -NR⁹SO₂R⁸, -P(O)(OR⁸)₂, -OP(O)(OR⁸)₂, -P(O)(OR¹⁰)₂, -OP(O)(OR¹⁰)₂, -N(OR⁸)R⁸, -CH=CHCO₂R⁸, -C(=NH)-N(R⁹)₂, y -(CH₂)_nNHC(O)R⁸; n es, independientemente en cada caso, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; cada m se selecciona, independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y t es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; o (c) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) o (b).

Otros compuestos de benzonafiridina, y procedimientos para preparar compuestos de benzonafiridina, se describen en el documento US 2009/111337 y en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2010//047587. Un compuesto de benzonafiridina, o una sal del mismo, se puede usar por sí mismo, o junto con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, un compuesto de benzonafiridina se puede usar junto con una emulsión de aceite en agua o una composición que contiene aceite mineral. En una realización particular, un compuesto de benzonafiridina se utiliza junto con una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, una emulsión de escualeno-agua, tal como MF59) o una composición que contiene un mineral (por ejemplo, una sal mineral tal como una sal de aluminio o una sal de calcio).

- Un compuesto de tiosemicarbazona, tales como los que se desvelan en el documento WO2004/060308. Los procedimientos de formulación, fabricación y cribado de compuestos activos también se describe en el documento WO2004/060308. Las tiosemicarbazonas son especialmente eficaces para estimular las células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF-α.
- Un compuesto de triptantrina, tales como los que se desvelan en el documento WO2004/064759. Los procedimientos de formulación, fabricación y cribado de compuestos activos también se describe en el documento WO2004/064759. Las tiosemicarbazonas son especialmente eficaces para estimular las células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF-α.
- Un análogo de nucleósido, tales como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



y profármacos del mismo; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 6.924.271; el documento US2005/0070556 y la patente de Estados Unidos n.º 5.658.731; (f) un compuesto que tiene la fórmula:



5

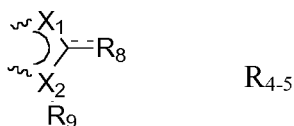
en la que:

R₁ y R₂ son cada uno independientemente H, halo, -NR_aR_b, -OH, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, alquilo C₁₋₆ o alquilo C₁₋₆ sustituido;

10

R₃ está ausente, H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, heterociclilo, o heterociclilo sustituido;

R₄ y R₅ son cada uno independientemente H, halo, heterociclilo, heterociclilo sustituido, -C(O)-R_d, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, o unido entre sí para formar un anillo de 5 miembros como en R₄₋₅:



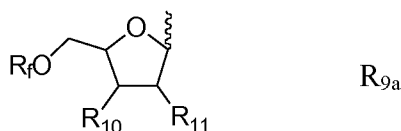
consiguiéndose la unión en los enlaces indicados por un ~~~

15

X₁ y X₂ son cada uno independientemente N, C, O, o S;

R₈ es H, halo, -OH, alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, -OH, -NR_aR_b, -(CH₂)_n-O-R_c, -O-(alquilo C₁₋₆), -S(O)_pR_e, o -C(O)-R_d;

R₉ es H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido o R_{9a}, en la que R_{9a} es:



20

consiguiéndose la unión en el enlace indicado por un ~~~

R₁₀ y R₁₁ son cada uno independientemente H, halo, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, -NR_aR_b, u -OH;

cada R_a y R_b es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, -C(O)R_d, arilo C₆₋₁₀;

cada R_c es independientemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo C₁₋₆ o alquilo C₁₋₆ sustituido;

25

cada R_d es independientemente H, halo, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₆), -NH(alquilo C₁₋₆ sustituido), -N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquilo C₁₋₆ sustituido)₂, arilo C₆₋₁₀, o heterociclilo;

cada R_e es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, heterociclilo, o heterociclilo sustituido;

cada R_f es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, -C(O)R_d, fosfato, difosfato o trifosfato;

30

cada n es independientemente 0, 1, 2, o 3;

cada p es independientemente 0, 1, o 2; o

o (g) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) a (f), un tautómero de cualquiera de (a) a (f), o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) (patente de Estados Unidos n.º 5.011.828).
- Los compuestos desvelados en el documento WO2004/87 153, que incluyen: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoleidona, compuestos de tetrahidroisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobenzimidazol quinolinona (ABIQ) (patente de Estados Unidos n.º 6.605.617, documento WO02/18383), compuestos de hidraptalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esterol, compuestos de quinazolinona, compuestos de pirrol (documento WO2004/018455), compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina, y compuestos de benzazol (documento WO03/082272).
- Los compuestos desvelados en el documento WO2006/002422.
- Un derivado de fosfato de aminoalquilglucosaminida, tal como RC-529 (Johnson y col. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278, Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229).
- Un fosfazeno, tal como poli[di(carboxilatofenoxi)fosfazeno] ("PCPP") como se describe, por ejemplo, en Andrianov y col. (1998) Biomaterials 19:109-115 y Payne y col. (1998) AdvDrug Delivery Review 31:185-196.
- Inmunopotenciadores de molécula pequeña (SMIP) tales como:

- N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina
- N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina
- 1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina
- N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina
- 1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina
- 1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina
- 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etanol
- (metil)amino]etilacetato de 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il]
- 4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona
- N2-butil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina
- N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina
- N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina
- 1-[4-amino-2-[metil(propil)amino]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol
- 1-[4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol
- N4,N4-dibencil-1-(2-metoxi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina.

Los agentes inductores de citoquinas para su uso en la presente invención pueden ser moduladores y/o agonistas de los receptores de tipo Toll (TLR). Por ejemplo, pueden ser agonistas de uno o más de las proteínas TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y/o TLR9 humanas. Los agentes preferidos son agonistas de TLR4 (por ejemplo el líquido As natural modificado derivado de lipopolisacáridos bacterianos, compuestos de fosfolípidos, tales como el dímero de fosfolípido sintético, E6020), TLR7 (por ejemplo, benzonaftiridinas, imidazoquinolinas) y/o TLR9 (por ejemplo, oligonucleótidos CpG). Estos agentes son útiles para activar las rutas de la inmunidad innata.

El agente inductor de citoquinas se puede añadir a la composición en varios momentos durante su producción. Por ejemplo, puede estar dentro de una composición de antígeno, y a continuación, esta mezcla se puede añadir a una emulsión de aceite en agua. Como alternativa, puede estar dentro de una emulsión de aceite en agua, en cuyo caso, el agente bien se puede añadir a los componentes de la emulsión antes de la emulsificación, o bien se puede añadir a la emulsión después de la emulsificación. De forma similar, el agente se puede coacervar dentro de las gotículas de la emulsión. La ubicación y la distribución del agente inductor de citoquinas dentro de la composición final dependerá de sus propiedades hidrófilas/lipófilas, por ejemplo, el agente se puede situar en la fase acuosa, en la fase oleosa, y/o en la interfase de aceite-agua.

El agente inductor de citoquinas se puede conjugar a un agente independiente, tal como un antígeno (por ejemplo, CRM197). Una revisión general de las técnicas de conjugación para moléculas pequeñas se proporciona en Thompson y col. (2003) Methods in Molecular Medicine 94:255-266. Como alternativa, los adyuvantes pueden estar asociados no covalentemente con agentes adicionales, tales como mediante interacciones hidrófobas o iónicas.

Los agentes inductores de citoquinas preferidos son (a) compuestos de benzonaftiridina; (b) oligonucleótidos inmunoestimuladores y (c) 3dMPL.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o (salvo el ARN) monocatenarios. Kandimalla y col. (2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400, documentos WO02/26757 y WO99/62923, desvelan posibles sustituciones de

análogos, *por ejemplo*, la sustitución de guanosina por 2'-desoxi-7-deazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se estudia adicionalmente en Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835; McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185; documento WO98/40100; patente de Estados Unidos n.º 6.207.646; patente de EE.UU. n.º 6.239.116 y patente de EE.UU. n.º 6.429.199. Una secuencia de CpG se puede dirigir a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT (Kandimalla y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3): 654-658). La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como una CpG-A ODN (oligodesoxinucleótido), o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como una CpG-B ODN. Las CpG-A y CpG-B ODN se analizan en Blackwell y col. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068, Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65; y el documento WO01/95935. Preferentemente, el CpG es una CpG-A ODN. Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de tal forma que el extremo 5' está accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG se pueden unir por sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las referencias Kandimalla y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3): 654-658; Kandimalla y col. (2003) *BBRC* 306:948-953; Bhagat y col. (2003) *BBRC* 300:853-861 y el documento WO03/035836. Un adyuvante de CpG útil es CpG7909, también conocido como PROMUNE (TM) (Coley Pharmaceutical Group, Inc.).

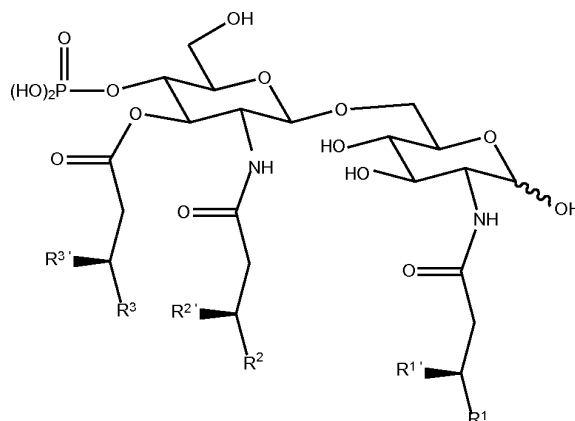
Como alternativa, o de forma adicional, al uso de secuencias CpG, se pueden usar secuencias TpG (documento WO01/22972). Estos oligonucleótidos pueden estar exentos de motivos CpG sin metilar.

El oligodesoxinucleótido inmunoestimulador puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo, TTTT (SEQ ID NO:17), como se desvela en el documento WO01/22972), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25 % de timidina (por ejemplo, >35 %, >40 %, >50 %, >60 %, >80 %, *etc.*). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citosina consecutivo (por ejemplo, CCCC (SEQ ID NO:18), como se desvela en el documento WO01/22972), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25 % de citosina (por ejemplo, >35 %, >40 %, >50 %, >60 %, >80 %, *etc.*). Estos oligonucleótidos pueden estar exentos de motivos CpG sin metilar.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores comprenderán, de forma típica, al menos 20 nucleótidos. Pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

3dMPL (también conocido como monofosforil lípido A 3 de-O-acilado o como 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A) es un adyuvante en el que la posición 3 del extremo reductor de la glucosamina en el monofosforil lípido A se ha desacilado. 3dMPL se ha preparado a partir de un mutante sin heptosa de *Salmonella minnesota* y es químicamente similar al lípido A, pero carece de un grupo fosforilo sensible a ácidos y un grupo acilo sensible a bases. Activa células del linaje de los monocitos/macrófagos y estimula la liberación de varias citoquinas, que incluye IL-1, IL-12, TNF- α y GM-CSF (véase también Thompson y col. (2005) *J Leukoc Biol* 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'). La preparación de 3dMPL fue originalmente descrita en la solicitud de patente británica GB-A-22202 11.

3dMPL puede tomar la forma de una mezcla de moléculas relacionadas, diversificadas por su acilación (por ejemplo, que tienen 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas, que pueden tener diferentes longitudes). Los dos monosacáridos de glucosamina (también conocida como 2-desoxi-2-amino-glucosa) están N-acilados en los átomos de carbono de la posición 2 (es decir, en las posiciones 2 y 2'), y también existe O-acilación en la posición 3'. El grupo unido al átomo de carbono 2 tiene la fórmula -NH-CO-CH₂-CR¹R^{1'}. El grupo unido al átomo de carbono 2' tiene la fórmula -NH-CO-CH₂-CR²R^{2'}. El grupo unido al átomo de carbono 3' tiene la fórmula -O-CO-CH₂-CR³R^{3'}. Una estructura representativa es:



Los grupos R¹, R² y R³ son cada uno independientemente -(CH₂)_n-CH₃. El valor de *n* está preferentemente entre 8 y 16, más preferentemente entre 9 y 12, y lo más preferible es 10.

Los grupos R^{1'}, R^{2'} y R^{3'} pueden ser cada uno independientemente: (a) -H; (b) -OH; o (c) -O-CO-R⁴, donde R⁴ es uno

cualquiera de -H o $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$, en la que el valor de m está preferentemente comprendido entre 8 y 16, y es más preferentemente 10, 12 o 14. En la posición 2, m es preferentemente 14. En la posición 2', m es preferentemente 10. En la posición 3', m es preferentemente 12. Los grupos R^1 , R^2 y R^3 son por tanto preferentemente grupos -O-acilo del ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico o ácido hexadecanoico.

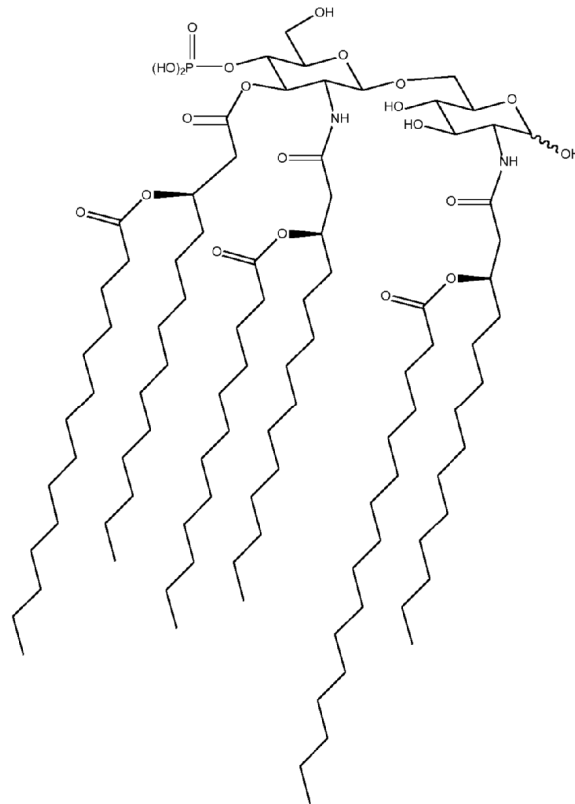
- 5 Cuando todos los R^1 , R^2 y R^3 son -H entonces el 3dMPL solo tiene 3 cadenas aciladas (una en cada una de las posiciones 2, 2' y 3'). Cuando solamente dos de R^1 , R^2 y R^3 son -H entonces el 3dMPL puede tener 4 cadenas aciladas. Cuando solamente uno de R^1 , R^2 y R^3 es -H entonces el 3dMPL puede tener 5 cadenas aciladas. Cuando ninguno de R^1 , R^2 y R^3 es -H entonces el 3dMPL puede tener 6 cadenas aciladas. El adyuvante de 3dMPL utilizado de acuerdo con la invención puede ser una mezcla de estas formas, con de 3 a 6 cadenas aciladas, pero se prefiere incluir un 3dMPL con 6 cadenas aciladas en la mezcla y, en particular, para garantizar que la forma de cadena de hexaacilo supone un 10 % en peso del total de 3dMPL, por ejemplo, >20 %, >30 %, >40 %, > 50 % o más. Se ha descubierto que un 3dMPL con 6 cadenas aciladas es la forma más activa como adyuvante.

De esta manera, la forma más preferida de 3dMPL para su inclusión en composiciones de la invención tiene la fórmula (IV), que se muestra a continuación.

- 15 Cuando se utiliza 3dMPL en forma de una mezcla, entonces las referencias a las cantidades o concentraciones de 3dMPL en las composiciones de la invención se refieren a la combinación de especies de 3dMPL en la mezcla.

- 20 En condiciones acuosas, 3dMPL puede formar agregados micelares o partículas con diferentes tamaños (por ejemplo, con un diámetro <150 nm o >500 nm. Cualquiera o ambos de estos se puede usar en la invención y lo mejor es que las partículas se pueden seleccionar en un ensayo rutinario. Las partículas más pequeñas (por ejemplo, lo suficientemente pequeñas para producir una suspensión acuosa transparente de 3dMPL) se prefieren para su uso de acuerdo con la invención debido a su mayor actividad (documento WO94/21292). Las partículas preferidas pueden tener un diámetro medio menor de 220 nm, más preferentemente menor de 200 nm o menor de 150 nm o menor de 120 nm, e incluso puede tener un diámetro medio menor de 100 nm. En la mayoría de los casos, sin embargo, el diámetro medio no será menor de 50 nm. Estas partículas son lo suficientemente pequeñas como para ser adecuadas para la esterilización mediante filtración. El diámetro de partícula se puede evaluar por la técnica rutinaria de la dispersión de luz dinámica, que revela un diámetro medio de partícula. Cuando se dice que una partícula tiene un diámetro de x nm, generalmente, habrá una distribución de partículas alrededor de este valor medio, pero al menos un 50 % en número (por ejemplo, >60 %, >70 %, >80 %, >90 %, o más) de las partículas tendrán un diámetro comprendido en el intervalo $x \pm 25$ %.

- 30 3dMPL se puede usar ventajosamente junto con una emulsión de aceite en agua. Prácticamente la totalidad del 3dMPL se puede situar en la fase acuosa de la emulsión. El 3dMPL se puede usar por sí mismo, o junto con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, se conoce el uso de 3dMPL junto con la saponina QS21 (documento WO94/00153) (incluida una emulsión de aceite en agua (documento WO95/17210)), con un oligonucleótido inmunoestimulador, con ambos QS21 y un oligonucleótido inmunoestimulador, con fosfato de aluminio (documento WO96/26741), con hidróxido de aluminio (documento WO93/19780), o con fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio a la vez.

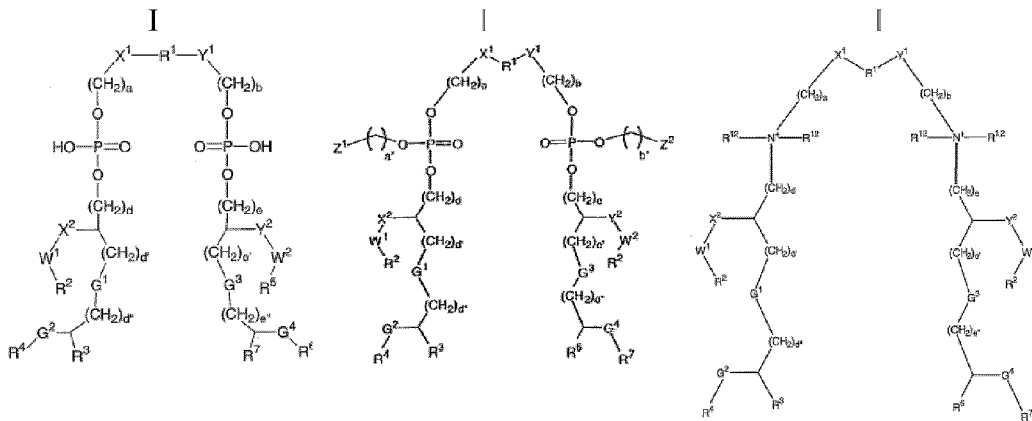


Fórmula (IV)

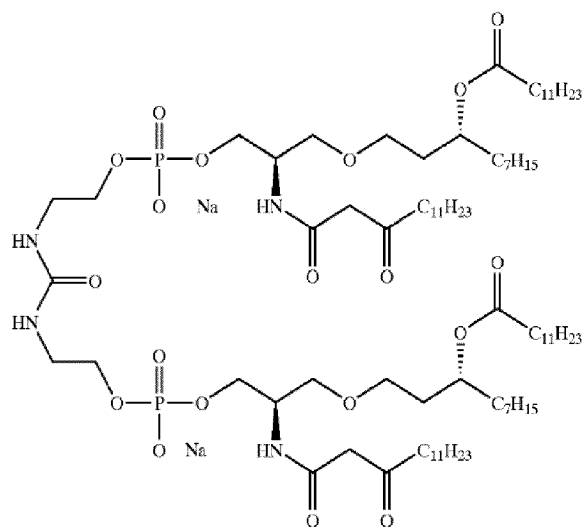
Adyuvantes grasos

Los adyuvantes grasos que se pueden usar con la invención incluyen las emulsiones de aceite en agua anteriormente descritas, y también incluyen, por ejemplo:

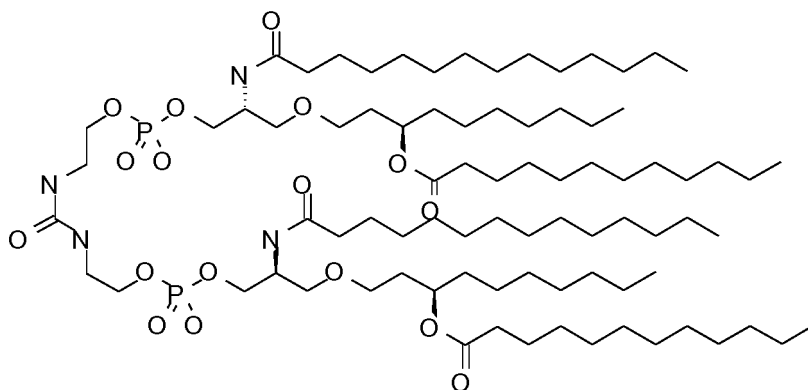
- 5 • Un compuesto de fosfolípido de fórmula I, II o III, o una sal del mismo:



como se define en el documento WO03/011223, tal como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', 'ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', 'ER 803022 o 'ER 804057' (por ejemplo,



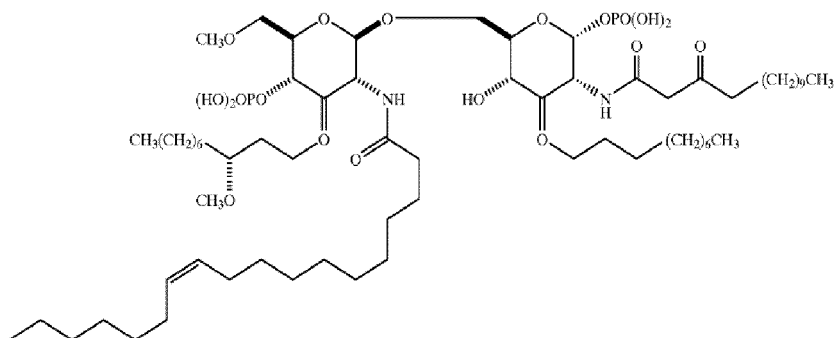
ER804057



ER-803022.

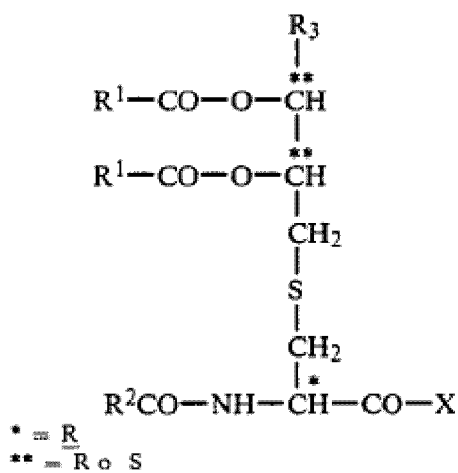
ER804057 también se denomina E6020. Un compuesto de fosfolípido de fórmula I, II o III, o una sal del mismo, se puede usar por sí mismo, o junto con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, un compuesto de fórmula I, II o III, se puede usar junto con una emulsión de aceite en agua o una composición que contiene aceite mineral. En una realización particular, E6020 se utiliza junto con una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, una emulsión de escualeno-agua, tal como MF59) o una composición que contiene un mineral (por ejemplo, una sal mineral tal como una sal de aluminio o una sal de calcio).

- Derivados del lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174 (descrito en Meraldi y col. (2003) Vaccine 21:2485-2491 y Pajak y col. (2003) Vaccine 21:836-842).
- Una formulación de un lípido catiónico y un colípido (habitualmente neutro), tal como aminopropildimetilmiristoleiloxi-propanaminio bromuro de difitanoilfosfatidiletanolamina ("VAXFECTIN (TM)") o aminopropildimetilbis-dodeciloxi-propanaminio bromuro de dioleoilfosfatidiletanolamina ("GAP-DLRIE:DOPE"). Se prefieren las formulaciones que contienen sales de (+)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(sin-9-tetradeceneiloxi)-1-propanaminio (patente de Estados Unidos n.º 6.586.409).
- Monofosforil lípido A 3-O-desacilado (véase anteriormente).
- Compuestos que contienen lípidos unidos a una estructura principal acílica que contiene fosfato, tal como el antagonistas de TLR4, E5564 (Wong y col. (2003) J Clin Pharmacol 43(7):735-42, documento US2005/0215517):



- Lipopéptidos (es decir, compuestos que comprenden uno o más restos de ácido graso y dos o más restos de

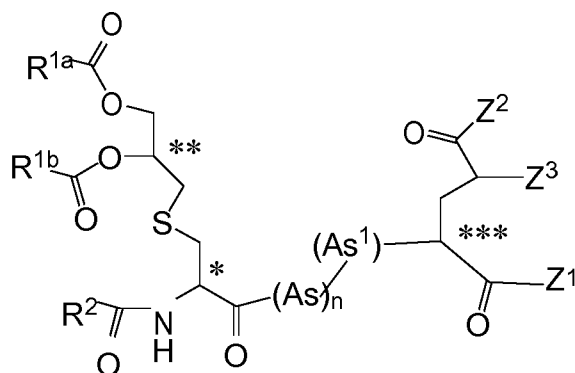
aminoácidos), tales como los lipopéptidos basados en glicerilcisteína. Los ejemplos específicos de dichos péptidos incluyen compuestos de la siguiente fórmula



5 en la que cada uno de R¹ y R² representa un radical hidrocarbonado saturado o insaturado, alifático o mixto de alifático-cicloalifático que tiene de 8 a 30, preferentemente de 11 a 21, átomos de carbono que también están
 10 opcionalmente sustituidos por funciones de oxígeno, R³ representa hidrógeno o el radical R¹-CO-O-CH₂- en la que R¹ tiene el mismo significado que anteriormente, y X representa un aminoácido unido por un enlace peptídico que tiene un grupo carboxi libre, esterificado o amidado, o una secuencia de aminoácidos de 2 a 10 aminoácidos en la que el grupo del extremo carboxilo está en su forma libre, esterificada o amidada. En determinadas realizaciones,
 la secuencia de aminoácidos comprende un aminoácido D, por ejemplo, ácido D-glutámico (D-Glu) o ácido D-gamma-carboxiglutámico (D-Gla).

15 Los lipopéptidos bacterianos generalmente reconocen TLR2, sin necesidad de que TLR6 participe. (Los TLR actúan de forma cooperativa para proporcionar un reconocimiento específico de diferentes desencadenantes, y TLR2 junto con TLR6 reconocen peptidoglicanos, mientras que TLR2 reconoce los lipopéptidos sin el TLR6). Estos se clasifican a veces como lipopéptidos naturales y lipopéptidos sintéticos. Los lipopéptidos sintéticos tienden a comportarse de forma similar, y se reconocen principalmente mediante TLR2.

Los lipopéptidos adecuados para su uso como adyuvantes incluyen compuestos que tienen la fórmula:

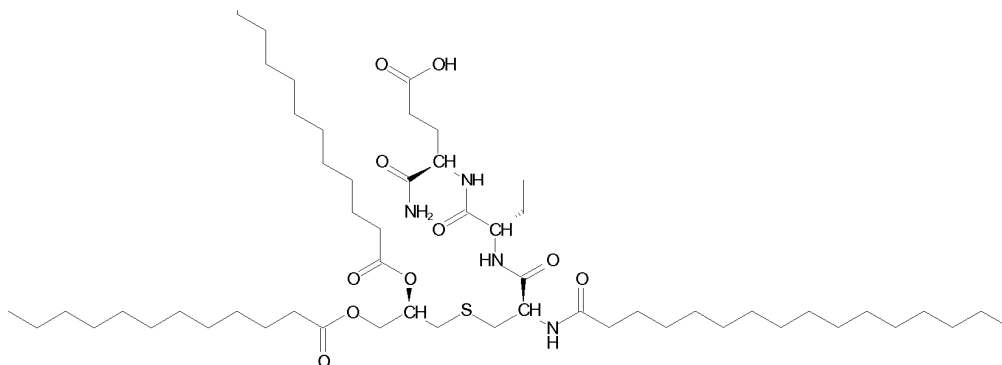


donde el centro quiral marcado con * y el marcado con *** están ambos en la configuración R;

20 el centro quiral marcado con ** está en cualquiera de la configuración R o S;
 cada R^{1a} y R^{1b} es independientemente un grupo hidrocarburo alifático o cicloalifático-alifático que tiene 7-21 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por funciones de oxígeno, o uno de R^{1a} y R^{1b}, pero no ambos, es H;
 R² es un grupo hidrocarburo alifático o cicloalifático que tiene 1-21 átomos de carbono y opcionalmente sustituido por funciones de oxígeno;
 25 n es 0 o 1;
 As representa uno de -O-Kw-CO- o -NH-Kw-CO-, donde Kw es un grupo hidrocarburo alifático que tiene 1-12 átomos de carbono;
 As¹ es un D o L-alfa-aminoácido;
 cada uno de Z¹ y Z² representa independientemente -OH o el radical del extremo N de un D o L alfa-aminoácido
 30 de un ácido amino-(alcano inferior)-sulfónico o de un péptido que tiene hasta 6 aminoácidos seleccionados entre

los ácidos D y L-alfa aminocarboxílicos y ácidos amino-alquilo inferior-sulfónicos; y Z^3 es H o $-CO-Z^4$, donde Z^4 es $-OH$ o el radical del extremo N de un D o L alfa-aminoácido de un ácido amino-(alcano inferior)-sulfónico o de un péptido que tiene hasta 6 aminoácidos seleccionados entre los ácidos D y L-alfa aminocarboxílicos y ácidos amino-alquilo inferior-sulfónicos; o un éster o amida formados a partir del ácido carboxílico de dichos compuestos. Las amidas adecuadas incluyen $-NH_2$ y NH (alquilo inferior), y los ésteres adecuados incluyen ésteres de alquilo C₁-C₄, (alquilo inferior o alcano inferior, como se usa en el presente documento, se refiere a alquilos C₁-C₆ de cadena lineal o ramificada).

Dichos compuestos se describen de manera más detallada en el documento US 4.666.886. En una realización particular, el lipopéptido tiene la fórmula:



Otro ejemplo de una especie de lipopéptido se denomina LP40, y es un agonista de TLR2. Akdis, y col., Eur. J. Immunology, 33: 2717-26 (2003).

Está relacionado con una clase conocida de lipopéptidos derivados de *E. coli*, denominados como lipoproteínas de mureína. Algunos productos de degradación parcial de estas proteínas denominados lipopéptidos de mureína se describen en Hantke, y col., Eur. J. Biochem., 34: 284-296 (1973). Comprenden un péptido unido a un ácido N-acetil murámico y por tanto están relacionados con los péptidos de muramilo, que se describen en Baschang, y col., Tetrahedron, 45(20): 6331-6360 (1989).

Adyuvantes de sal de aluminio

Se pueden usar los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" y "fosfato de aluminio". Estos nombres son convencionales, pero se utilizan solo por comodidad de uso, ya que ninguno de ellos es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). La invención puede utilizar cualquiera de los adyuvantes de "hidróxido" o "fosfato" que se utilizan de forma general como adyuvantes.

Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son de forma típica sales de oxihidróxido de aluminio, que son habitualmente al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que se puede representar mediante la fórmula $AlO(OH)$, se puede distinguir de otros compuestos de aluminio, tales como el hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$, por espectroscopia infrarroja (IR), especialmente por la presencia de una banda de absorción a 1070 cm^{-1} y un hombro intenso a $3090\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ (capítulo 9 de Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por el ancho de banda la difracción a mitad de altura (WHH), donde las partículas poco cristalinas muestran un mayor ancho de línea debido a tamaños más pequeños de los cristallitos. El área superficial aumenta cuando lo hace el WHH, y se ha observado que los adyuvantes con mayores valores de WHH tienen mayor capacidad de absorción de antígenos. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como se observa en las micrografías de transmisión electrónica) es típica de los adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pI de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es, de forma típica, aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se han notificado capacidad de adsorción entre 1,8-2,6 mg proteínas por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para los adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son de forma típica hidroxifosfatos de aluminio, que frecuentemente también contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, sulfato hidroxifosfatos de aluminio). Se pueden obtener mediante precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación afectan el grado de sustitución del hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos tienen generalmente una relación molar PO_4/Al comprendida entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos se pueden distinguir del $AlPO_4$ estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro IR a 3164 cm^{-1} (por ejemplo, cuando se calienta a $200\text{ }^\circ\text{C}$) indica la presencia de hidroxilos estructurales (cap. 9 de Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X))

5 La relación molar $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ de un adyuvante de fosfato de aluminio estará generalmente comprendida entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente 0,95+0,1. El fosfato de aluminio generalmente será amorfo, especialmente para las sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es un hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar de PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio generalmente estará en forma de partículas (por ejemplo, morfología en placas como se observa en las micrografías de transmisión electrónica). Los diámetros típicos de las partículas están comprendidos en el intervalo de 0,5-20 μm (por ejemplo, aproximadamente 5-10 μm) después de la adsorción de cualquier antígeno. Se han notificado capacidad de adsorción entre 0,7-1,5 mg proteínas por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para los adyuvantes de fosfato de aluminio.

10 El punto de carga cero (PZC) del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución del fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y de la concentración de Los reactivos utilizados para preparar la sal mediante precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato = PZC más ácido) o mediante la adición de un tampón tal como un tampón de histidina (hace que el PZC sea más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención tendrán por lo general un PZC entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5, *por ejemplo*, aproximadamente 5,7.

15 Las suspensiones de sales de aluminio utilizadas para preparar composiciones de la invención pueden contener un tampón (por ejemplo, un tampón de fosfato o de histidina o de Tris), pero esto no es siempre necesario. La suspensiones son preferentemente estériles y están exentas de pirógenos. Una suspensión puede incluir iones fosfato acuoso libres (por ejemplo, presentes a una concentración entre 1,0 y 20 M, preferentemente entre 5 y 15

M, y más preferentemente aproximadamente 10 M. Las suspensiones también pueden comprender cloruro de sodio.

La invención puede usar una mezcla tanto de hidróxido de aluminio como de fosfato de aluminio. En este caso, puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido (por ejemplo, una relación de peso de al menos 2:1 (por ejemplo, >5:1, >6:1, >7:1, >8:1, >9:1, etc.

- 5 La concentración de Al⁺⁺⁺ en una composición para su administración a un paciente es preferentemente menor de 10 mg/ml por ejemplo, <5 mg/ml, <4 mg/ml, <3 mg/ml, <2 mg/ml, <1 mg/ml, etc. Un intervalo preferido está comprendido entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere una dosis máxima de 0,85 mg/dosis.

10 Tal como la inclusión de uno o más adyuvantes de sal de aluminio, el componente adyuvante puede incluir uno o más adyuvantes o agentes inmunoestimulantes adicionales. Dichos componentes adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa: un compuesto de benzonaftiridina, un adyuvante de monofosforil lípido A 3-O-desacilado ('3d-MPL'); y/o una emulsión de aceite en agua. 3d-MPL también se ha denominado como monofosforil lípido A 3 de-O-acilado o como 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A. El nombre indica que la posición 3 del extremo reductor de la glucosamina en el monofosforil lípido A está desacilado. Se ha preparado a partir de un mutante sin heptosa de *S.minnesota*, y es químicamente similar al lípido A, pero carece de un grupo fosforilo sensible a ácidos y un grupo acilo sensible a bases.

15 Activa células del linaje de los monocitos/macrófagos y estimula la liberación de varias citoquinas, que incluye IL-1, IL-12, TNF- α y GM-CSF. La preparación del 3d-MPL fue originalmente descrita en la solicitud de patente británica GB-A-22202 11, y el producto se fabrica y se vende por Corixa Corporation con el nombre MPL (TM). Se pueden encontrar otros detalles en Myers y col. (1990) páginas 145-156 de Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions; Ulrich (2000) Capítulo 16 (páginas 273-282) de Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de la serie Methods in Molecular Medicine). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan; Johnson y col. (1999) J Med Chem 42:4640-9; y Baldrick y col. (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413.

20 El uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o de fosfato de aluminio es útil, especialmente en niños, y los antígenos suelen estar adsorbidos en estas sales. También se prefieren las emulsiones de escualeno en agua, especialmente en las personas mayores. Las combinaciones adyuvantes útiles incluyen combinaciones de los adyuvantes Th1 y Th2, tales como CpG y alum, o resiquimod y alum. Se puede utilizar una combinación de fosfato de aluminio y 3dMPL. Otras combinaciones que se pueden utilizar incluyen: alum y un compuesto de benzonaptiridina o un SMIP, una emulsión de escualeno en agua (tal como MF59) y un compuesto de benzonaptiridina o un SMIP, y E6020 y una emulsión de escualeno en agua, tal como MF59) o alum.

25 Las composiciones de la invención pueden desencadenar una respuesta inmunitaria mediada por células, así como una respuesta inmunitaria humoral.

Se cree que por lo general son necesarios dos tipos de linfocitos T, CD4 y CD8, para iniciar y/o mejorar la inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral. Los linfocitos T CD8 pueden expresar un correceptor de CD8 y se citan comúnmente como linfocitos T citotóxicos (CTL). Los linfocitos T CD8 son capaces de reconocer o interactuar con antígenos presentados en moléculas de la clase I del MHC.

35 Los linfocitos T CD4 pueden expresar un correceptor de CD4 y se denominan comúnmente como linfocitos T colaboradores. Los linfocitos T CD4 son capaces de reconocer péptidos antigénicos unidos a moléculas de la clase II del MHC. Tras la interacción con una molécula de clase II del MHC, las células CD4 pueden secretar factores tales como citoquinas. Estas citoquinas secretadas pueden activar los linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, macrófagos y otras células que participan en una respuesta inmunitaria. Los linfocitos T colaboradores o las células CD4⁺ pueden dividirse adicionalmente en dos subconjuntos funcionalmente distintos: el fenotipo TH1 y los fenotipos TH2, que difieren en su función efectora y de citoquinas.

40 Los linfocitos TH1 activados potencian la inmunidad celular (incluyendo un aumento en la producción de CTL específicos de antígeno) y por lo tanto, son particularmente valiosos en la respuesta a infecciones intracelulares. Los linfocitos TH1 pueden secretar uno o más de IL-2, IFN- γ y TNF- β . Una respuesta inmunitaria TH1 puede dar como resultado reacciones inflamatorias locales debido a la activación de macrófagos, linfocitos NK (citólíticos naturales) y linfocitos T citotóxicos CD8 (CTL). Una respuesta inmunitaria TH1 también puede actuar para expandir la respuesta inmunitaria mediante la estimulación del crecimiento de linfocitos B y T con IL-12. Los linfocitos B estimulados por TH1 pueden secretar IgG2a.

45 Una respuesta inmunitaria TH1 puede incluir uno o más de un aumento en los CTL, un aumento en una o más de las citoquinas asociadas con una respuesta inmunitaria TH1 (tales como IL-2, IFN- γ y TNF- β), un aumento en los macrófagos activados, un aumento en la actividad NK o un aumento en la producción de IgG2a. Preferentemente, la respuesta inmunitaria TH1 potenciada incluirá un aumento en la producción de IgG2a.

50 Puede desencadenarse una respuesta inmunitaria TH1 usando un adyuvante de TH1. Por lo general, un adyuvante de TH1 provocará niveles aumentados de producción de IgG2a en relación con la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes de TH1 adecuados para su uso en la invención pueden incluir, por ejemplo, formulaciones de saponina, virosomas y partículas pseudovíricas, derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), oligonucleótidos inmunoestimulantes. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes, tales como los oligonucleótidos que contienen un motivo CpG, son adyuvantes de TH1 preferidos para su uso en la invención.

La respuesta inmunitaria mejorada puede ser una o ambas de una respuesta inmunitaria sistémica y una mucosal. Preferentemente, la respuesta inmunitaria posibilita una o ambas de una respuesta inmunitaria sistémica mejorada y una mucosal mejorada.

Procedimientos de tratamiento, uso y administración

- 5 Las composiciones desveladas en el presente documento son adecuadas para su administración a mujeres embarazadas y bebés, en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en una mujer embarazada y/o bebe, que comprende la etapa de administrar una composición (por ejemplo, una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS) a la mujer embarazada y/o bebé. Las composiciones (por ejemplo, una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS) se pueden usar para producir una formulación de vacuna para inmunizar una mujer embarazada y/o un bebé. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria se puede desencadenar después de la administración de una proteína VRS F purificada, una partícula de replicón de alfavirus, o un ARN autorreplicante.

La invención también proporciona una composición de la invención para su uso como medicamento, por ejemplo, para su uso en la inmunización de un paciente contra una infección por el VRS.

- 15 También se describe una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS para su uso en la provisión de una inmunidad protectora contra el VRS en un bebé por un procedimiento que comprende (a) administrar una primera composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS a una mujer durante el embarazo; y (b) administrar una segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS al bebé que ha nacido del embarazo.
- 20 También se describe una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS para su uso en desencadenar una respuesta inmunitaria en una mujer embarazada por un procedimiento que comprende (a) administrar una primera composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS a la mujer; y (b) administrar una segunda composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS al bebé que ha nacido del embarazo.
- 25 También se describe una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS para su uso en la provisión de una inmunidad protectora contra el VRS en un bebé, en el que el bebé nació de una mujer a la cual se administró una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS durante el tiempo en el la mujer estuvo embarazada del bebé.

- 30 También se describe una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS para su uso en la provisión de una inmunidad protectora contra el VRS en un bebé, en la que el bebé tiene los anticuerpos maternos contra el VRS.

- La presencia de anticuerpos maternos contra el VRS en el bebé se puede evaluar usando cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, puesto que el sistema inmunitario del bebé es inmaduro, los anticuerpos contra el VRS, especialmente los anticuerpos de IgG, presentes en el bebé durante las primeras semanas y meses después del nacimiento (por ejemplo, desde el nacimiento hasta a aproximadamente 2 o 3 o 4 meses) son los anticuerpos maternos. Se conocen en la técnica muchos procedimientos para determinar si hay anticuerpos maternos que se unan a antígenos de patógenos. Véanse, por ejemplo, Pappaioanou M, y col., Accurate Detection of Maternal Antibodies to HIV in Newborn Whole Blood Dried on Filter Paper, AIDS 7(4):483-488 (1993), y Pinon J.M. y col., Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobulin G, M, y A Antibodies, J. Clin. Microbiol. 39(6):2267-2271 (2001).

- 40 También se describe el uso de un polipéptido como se ha descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento para desencadenar una respuesta inmunitaria en un paciente.

- La respuesta inmunitaria producida según estos procedimientos y uso incluirá por lo general una respuesta de anticuerpos, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectora. Los procedimientos para evaluar las respuestas de anticuerpos después de una vacunación contra el VRS son bien conocidos en la técnica.

- 45 Las composiciones de la invención se pueden administrar de numerosas formas, tales como inyección intramuscular (por ejemplo, en el muslo, inyección subcutánea, administración intranasal, administración oral, administración intradérmica, administración transcutánea, administración transdérmica, y similares. La vía de administración adecuada dependerá de la edad, estado de salud y otras características de la mujer embarazada o del bebé. Un especialista clínico podrá determinar una vía de administración adecuada basándose en estos y otros factores.

- 50 El tratamiento puede ser una pauta en una sola dosis o una pauta en múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. En una pauta de múltiples dosis, las múltiples dosis se pueden administrar por la misma vía o por vías diferentes, *por ejemplo*, un cebado parenteral y un refuerzo mucosal, un estímulo mucosal y un refuerzo parenteral, *etc.* La administración de más de una dosis (de forma típica dos dosis) es especialmente útil en pacientes sin exposición inmunitaria previa. Las dosis múltiples se administrarán, de forma típica, en intervalos de al menos 1 semana (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas,

aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, y similar).

Las formulaciones de vacuna producidas usando una composición de la invención se pueden administrar a los pacientes en sustancialmente el mismo momento (por ejemplo, durante la misma consulta al médico o visita a un profesional sanitario o centro de vacunación) que otras vacunas.

Ejemplos

Ejemplo 1.

La eficacia e inmunogenicidad del régimen de inmunización descrito en el presente documento se puede evaluar, por ejemplo, usando modelos animales adecuados.

En un ejemplo, ratas del algodón hembra recibirán una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS, antes y/o después del emparejamiento para inducir la producción de anticuerpos contra el VRS durante el embarazo. Como alternativa, las ratas del algodón hembra se pueden infectar con el VRS antes del emparejamiento y recibir un refuerzo con una composición inductora de una respuesta inmunitaria antes y/o después del emparejamiento para aumentar la producción de anticuerpos contra el VRS durante el embarazo. La presencia y título de los anticuerpos dirigidos contra el VRS en la rata del algodón embarazada se puede evaluar usando cualquier procedimiento adecuado, tal como los ensayos de títulos neutralizantes descritos en el presente documento o mediante un ELISA. Los anticuerpos producidos en la rata del algodón embarazada atravesarán la placenta y entrarán en la circulación fetal. Tras el nacimiento, las ratas neonatas serán amamantadas por su madre o por una rata del algodón no expuesta al tratamiento (que no ha estado expuesta al VRS ni a una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS). Se pueden transferir anticuerpos dirigidos contra el VRS a las crías de ratas del algodón por amamantamiento de hembras que fueron inmunizadas con una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS o infectadas con VRS y reforzadas con una composición inductora dirigida contra el VRS. Algunas de las ratas recién nacidas recibirán una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS una o más veces (por ejemplo, un estímulo seguido de uno o más refuerzos). Cuando una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS se administra a un recién nacido dos o más veces, las composiciones serán iguales o diferentes. Los niveles de anticuerpo dirigido contra el VRS en crías de rata del algodón se pueden evaluar en varios puntos temporales después del nacimiento por cualquier procedimiento adecuado, tal como los ensayos de títulos neutralizantes descritos en el presente documento o mediante un ELISA. Los niveles de protección contra el VRS transmitidos por los regímenes de inmunización se pueden evaluar estimulando las crías de ratas del algodón con VRS y evaluando los títulos del virus en los lavados nasales o pulmones de las crías de ratas del algodón o examinando la patología de los pulmones o cavidad nasal de las crías de ratas del algodón. Comparando el nivel de anticuerpos dirigidos contra el VRS y los grados de protección contra el VRS en diferentes puntos temporales en crías de ratas del algodón que se han inmunizado o no de forma activa y que nacieron de madres o lactaron de hembras que habían tenido diferentes exposiciones al VRS (por ejemplo, ninguna, infección por el VRS, inmunización con una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS, o infección por VRS seguido por refuerzo con una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS) permitirá evaluar la eficacia e inmunogenicidad del régimen de inmunización del VRS descrito en el presente documento. En otro ejemplo, el potencial de baja eficacia de transferencia transplacentaria de los anticuerpos maternos al feto se resuelve mediante la transferencia manual de preparaciones que contienen el anticuerpo obtenidas de una rata del algodón adulta. Una rata del algodón adulta recibirá una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS para inducir la producción de anticuerpos dirigidos contra el VRS o se puede infectar con VRS y recibir un refuerzo con una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS. Los anticuerpos dirigidos contra el VRS (o suero que contiene los anticuerpos) se obtendrán de la rata del algodón y se administrarán a ratas del algodón no expuestas al tratamiento (ratas del algodón recién nacidas o jóvenes), por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal. Algunas de las ratas del algodón no expuestas al tratamiento recibirán una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS una o más veces (por ejemplo, un estímulo seguido de uno o más refuerzos). Cuando una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS se administra a ratas del algodón no expuestas al tratamiento dos o más veces, las composiciones serán iguales o diferentes. Los niveles de anticuerpo dirigido contra el VRS en crías de rata del algodón se pueden evaluar en varios puntos temporales después del nacimiento por cualquier procedimiento adecuado, tal como los ensayos de títulos neutralizantes descritos en el presente documento o mediante un ELISA. Los niveles de protección contra el VRS transmitidos por los regímenes de inmunización se pueden evaluar estimulando las crías de ratas del algodón con VRS y evaluando los títulos del virus en los lavados nasales o pulmones de las crías de ratas del algodón o examinando la patología de los pulmones o cavidad nasal de las crías de ratas del algodón. Comparando el nivel de anticuerpos dirigidos contra el VRS y los grados de protección contra el VRS en diferentes puntos temporales en crías de ratas del algodón que se han inmunizado o no de forma activa y que recibieron preparaciones que contenían anticuerpos obtenidas de ratas del algodón que habían tenido diferentes exposiciones al VRS (por ejemplo, ninguna, infección por el VRS, inmunización con una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS, o infección por VRS seguido por refuerzo con una composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS) permitirá evaluar la eficacia e inmunogenicidad del régimen de inmunización del VRS descrito en el presente documento.

Ensayo de neutralización del VRS

Se recogieron células HEp-2 de capas confluentes mediante tripsinización, se resuspendieron en medio de cultivo celular que contenía suero de feto bovino al 5 % (FBS) a una densidad de $6,5 \times 10^6$ células/ml, se sembraron en placas de 96 pocillos a 0,1 ml por pocillo, y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 3-6 horas.

- 5 El suero de ensayo y el suero de control se inactivaron térmicamente a 56 °C durante 30 minutos y se diluyeron en serie dos veces en suero salino tamponado con fosfato (PBS), albúmina de suero bovino al 5 % (BSA).

El suero diluido en serie se mezclará con volúmenes iguales de VRS que se habían prediluido en FBS al 5 % en PBS hasta una concentración tal que el volumen añadido produzca 80-140 sincitios/pocillo en ausencia de suero de ensayo. Las mezclas del VRS y el suero diluido en serie se incubarán durante 2 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %.

- 10 El medio se aspirará de la placa de ensayo sembrada con HEp-2 y las mezclas de virus-suero se añadirán a los pocillos de las placas. La placa se incubará durante 2 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las mezclas de virus-suero se aspirarán de la placa. Una solución a temperatura ambiente de metilcelulosa al 0,75 % en EMEM (exento de rojo fenol), FBS al 5 %, se añadirá a los pocillos. A continuación, la placa se incubará a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 40-46 horas.

- 15 La metilcelulosa se aspirará de los pocillos y se añadirá a los pocillos formalina tamponada al 10 %. La placa se incubará a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavarán tres veces con tampón de lavado (1 x PBS, Tween 20 al 0,05 %). Se añadirán a los pocillos tampón de permeabilización/bloqueo (D-PBS, FBS al 2,5 %, saponina al 0,5 %, NaAzida al 0,1 %), y la placa se incubará durante 1 h a temperatura ambiente.

- 20 El tampón de permeabilización/bloqueo se aspirará de los pocillos. A continuación, los pocillos se lavarán tres veces con tampón de lavado. Se añadirá a los pocillos una dilución 1:1000 en tampón de permeabilización/bloqueo de anticuerpos monoclonales que reconocen F y/o NP. La placa se incubará durante 1 hora a temperatura ambiente.

- 25 La solución de anticuerpo se aspirará. Los pocillos se lavarán tres veces con tampón de lavado. Se añadirá a los pocillos una dilución 1:1000 en tampón de permeabilización/bloqueo de un anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante y cadena ligera). La placa se incubará durante 1 hora a temperatura ambiente.

El anticuerpo secundario se aspirará de los pocillos. Los pocillos se lavarán tres veces con tampón de lavado. El sustrato de tripán blue se añadirá a los pocillos. La placa se incubará durante 10 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavará una vez con agua destilada y se aspirará a sequedad.

- 30 Los sincitios teñidos se contarán usando un analizador UV con un programa informático de adquisición de imágenes y recuento.

- 35 Los sincitios se contarán en pocillos de control que habrán sido incubados con virus que no se habrían mezclado con suero. Los sincitios se contarán en los pocillos de muestra. Dos réplicas de cada pocillo se contarán y se promediarán. Se calculará la proporción de sincitios en los pocillos del control que permanezcan en los pocillos de muestra. Los valores de dilución del suero que proporcionan un 60 % de neutralización del virus se calculan por regresión lineal. La inversa de esta dilución es el título de neutralización al 60 %.

Ejemplo 2: La vacuna de la subunidad VRS F refuerza la respuesta de anticuerpos específica de VRS en ratas del algodón y ratones infectados por VIH**1. Procedimientos***Vacuna de subunidad con el trómero VRS F*

- 40 El trómero VRS F es una proteína recombinante que comprende el ectodominio de VRS F con una delección en la región del péptido de fusión que evita la asociación con otros trómeros. La construcción resultante forma un trómero homogéneo, tal como se observa mediante cromatografía de exclusión por tamaño, y tiene un fenotipo esperado consistente con una conformación de postfusión tal como se observa mediante microscopía electrónica. La proteína se expresó y purificó en células CHO. La muestra de proteína resultante mostró una pureza mayor del 95 %. Para la evaluación *in vivo* de la vacuna de subunidad F con hidróxido de aluminio (alum), la subunidad F se adsorbió en
- 45 2 mg/ml de alum usando tampón histidina 10 M pH 6,3, ajustado para la isotonicidad con cloruro de sodio. La subunidad F se adsorbió sobre alum durante la noche con suave agitación a 2-8 °C. Para la duración de la vacuna de la subunidad F con MF59, la proteína se diluyó en PBS y se mezcló con un volumen igual de 2X MF59 durante 2 horas antes de la inmunización y se mezcló mediante inversión suave.

- 50 *Vacunación e infección de ratas del algodón y ratones*

Las ratas algodón hembra (*Sigmodon hispidis*) se obtuvieron de los Harlan Laboratories y los ratones BALB/c hembra se obtuvieron de Charles River Laboratories. Todos los estudios fueron aprobados y se realizaron de acuerdo con el Novartis Animal Care and Use Committee. Grupos de 7 ratas del algodón se inocularon por vía intranasal (i.n.) con

1x10⁵ unidades formadoras de placas (ufp) de VRS en 100 µl y se inmunizaron por vía intramuscular (i.m.) con la vacuna de la subunidad VRS F (100 µl de volumen total en una extremidad posterior) 7 semanas después. Grupos de 7 ratones se inocularon i.n. con 1x10⁶ ufp de VRS en 50 µl y se inmunizaron i.m. con la vacuna de subunidad VRS F (100 µl de volumen total dividido entre las dos extremidades posteriores) 11 y 15 semanas después. Se incluyeron en el estudio dos animales no expuestos al tratamiento. Se recogieron muestras de suero en varios puntos temporales después de la inoculación con el VRS y 2 semanas después de cada inmunización con la subunidad de VRS F.

ELISA específico de VRS F

Las muestras de suero individuales de rata del algodón o ratón se analizaron para determinar la presencia de IgG específica de VRS F en un enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Las placas ELISA (MaxiSorp 96 pocillos, Nunc) se revistieron durante la noche a 4 °C con 1 µg/ml de proteína de VRS F purificada en PBS. Tras el lavado (PBS con Tween 20 al 0,1 %), las placas se bloquearon con tampón de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific) durante al menos 1 h a 37 °C. A continuación las placas se lavaron, se añadieron por duplicado diluciones en serie de 5 veces del suero en diluyente de ensayo (PBS con Tween 20 al 0,1 % y suero de cabra al 5 %) procedente de animales experimentales o del control, y las placas se incubaron durante 2 h a 37 °C. Tras el lavado, las placas se incubaron con un anticuerpo de detección contra IgG conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) diluido en diluyente de ensayo (dilución 1:50.000 de anticuerpo de pollo dirigido contra IgG de rata del algodón [Immunology Consultants Laboratory, Inc.] o dilución 1:30.000 de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón [Southern Biotech]) durante 1 h a 37 °C. Finalmente, las placas se lavaron y se añadieron a cada pocillo 100 µl de solución de sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc). Las reacciones se detuvieron por adición de 100 µl de H₃PO₄ 1 M, y la absorbancia se leyó a 450 nm usando un lector de placas. Para cada muestra de suero, se generó una representación gráfica de la densidad óptica (DO) frente al logaritmo del inverso de la dilución sérica mediante regresión no lineal (GraphPad Prism). Los títulos se definieron como el inverso de la dilución sérica a una DO_{450 nm} de aproximadamente 0,6, normalizado a una muestra de suero patrón incluida en cada placa (patrón de rata del algodón - suero combinado de ratas del algodón infectadas con VRS con un título definido de 1:2500, patrón de ratón - suero combinado de ratones BALB/c vacunados con la subunidad VRS F con adyuvante con un título definido de 1:269.773). Si el título de una muestra individual está por debajo de la primera dilución sérica analizada, 1:25, se le asignó un título de 1:5 para el fin de calcular la media del grupo.

Ensayo de neutralización del VRS

Las muestras de suero se analizaron para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes de VRS mediante un ensayo de neutralización de reducción de focos. Se añadieron diluciones en serie de dos veces de suero inactivado térmicamente (HI) (en PBS con un 5 % de HI-FBS) a un volumen igual de RSV Long previamente titulado para dar aproximadamente 115 ufp/25 µl. Las mezclas de suero/virus se incubaron durante 2 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %, para permitir la neutralización del virus, y a continuación 25 µl de esta mezcla (que contiene aproximadamente 115 ufp) se inoculó a pocillos duplicados de células HEp-2 en placas de 96 pocillos. Tras 2 h a 37 °C y CO₂ al 5 %, las células se superponen sobre metilcelulosa al 0,75 % que contenía medio con l 5 % y se incubaron durante 40-46 horas. El número de sincitios se enumeró mediante inmunotinción con anticuerpos monoclonales específicos de la fusión entre el VRS y las nucleoproteínas (AbD Serotec) seguido por recuento automático (analizador CTL Immunospot S5 UV). El título de neutralización se define como la inversa de la dilución sérica que produce al menos una reducción del 60 % en el número de sincitios por pocillo, respecto a los controles (sin suero). Si el título de una muestra está por debajo de la primera dilución sérica analizada, 1:20, se le asignó un título de 1:10 para el fin de calcular la media del grupo.

2. Resultados y conclusiones

Para modelar el uso de la subunidad F de la vacuna para aumentar los títulos de neutralización del suero en seres humanos adultos previamente infectados por VRS, grupos de 7 ratas del algodón o ratones adultos se inocularon i.n. con VRS y se inmunizaron i.m. con vacuna de subunidad VRS F con o sin adyuvante 7 semanas después (ratas del algodón) 11 y 15 semanas después (ratones). Los resultados de estos experimentos demuestran que la vacuna de subunidad VRS F refuerza eficazmente la IgG específica del suero F y las respuestas neutralizantes de VRS cebadas por la infección de VRS F en ratones y ratas del algodón (Tablas 1 y 2). Las veces de refuerzo en la respuesta de anticuerpos específica del VRS F da como resultado que la vacunación con la subunidad VRS F fue mayor en los ratones (10 a 50 veces de aumento en los títulos de neutralización y de 9 a 51 veces de aumento en el título de IgG específico de F) que en las ratas del algodón (4 a 6 veces de aumento en el título de neutralización y 7 a 25 veces de aumento en el título de IgG específico de F), pero en ambas especies, el aumento en el título fue muy independiente de las dosis de antígeno y adyuvante evaluadas (Tablas 1 y 2).

Tabla 1: Inmunogenicidad de la vacuna de subunidad VRS F en ratas del algodón seropositivas para VRS

Gr.	Infect ^a (sem 0)	Vacunación ^b (sem 7)	Título de IgG específico de F ^c		Título de neutralización de VRS sérico ^d		
			7 sem después de la infección	2 sem después de la vacunación	4 sem después de la infección	7 sem después de la infección	2 sem después de la vacunación
A	VRS	-	2,90 ± 0,19	2,80 ± 0,33	2,69 ± 0,03	2,44 ± 0,06	2,71 ± 0,03

ES 2 727 836 T3

B	VRS	5 µg de subunidad F	2,80 ± 0,35	4,16 ± 0,16	2,81 ± 0,08	2,64 ± 0,22	3,36 ± 0,13
C	VRS	5 µg de subunidad F/MF59	2,93 ± 0,33	4,32 ± 0,18	2,64 ± 0,13	2,65 ± 0,05	3,39 ± 0,10
D	VRS	0,5 µg de subunidad F/MF59	2,92 ± 0,24	3,99 ± 0,19	2,47 ± 0,02	2,67 ± 0,14	3,36 ± 0,05
E	VRS	0,05 µg de subunidad F/MF59	2,90 ± 0,23	3,87 ± 0,17	2,68 ± 0,07	2,47 ± 0,09	3,25 ± 0,08
F	VRS	5 µg de subunidad F/alum	3,24 ± 0,52	4,07 ± 0,14	2,80 ± 0,20	2,64 ± 0,13	3,24 ± 0,11
G	VRS	0,5 µg de subunidad F/alum	2,79 ± 0,12	3,92 ± 0,16	2,61 ± 0,09	2,39 ± 0,11	3,04 ± 0,06
H	VRS	0,05 µg de subunidad F/alum	3,06 ± 0,17	4,05 ± 0,22	2,80 ± 0,17	2,62 ± 0,06	3,24 ± 0,22
I	-	-	n.p.	n.p.	1,00	1,32	1,00

Abreviaturas: Gr - grupo, sem - semana, n.p. - no ensayado

^a 1x10⁵ ufp de VRS i.n.

^b i.m.

^c promedio del log₁₀ del título ± desviación estándar de 7 animales individuales por grupo

^d promedio del log₁₀ de títulos ± intervalo de 2 combinaciones de 3-4 animales por grupo (1 combinación de 2 animales en el Gr. I)

Tabla 2: Inmunogenicidad de la vacuna de subunidad VRS F en ratones BALB/c seropositivos para VRS

Gr.	Infect ^a (sem 0)	Vacunación ^b (sem 11 y 15)	Título de IgG específico de F ^c		Título de neutralización de VRS sérico ^d			
			11 sem después infección	2 sem después de la 1 ^a 2 ^a vacunación	11 sem después infección	2 sem después de la 1 ^a vacunación	2 sem después de la 2 ^a vacunación	
A	VRS	-	4,03 ± 0,11	4,09±0,12 4,10±0,12	2,11 ± 0,10	2,18 ± 0,03	2,50 ± 0,08	
B	VRS	5 µg de subunidad F	4,02 ± 0,10	5,36±0,11 5,40±0,10	2,03 ± 0,14	3,24 ± 0,15	3,42 ± 0,11	
C	VRS	0,5 µg de subunidad F	4,18 ± 0,11	5,29±0,06 5,43±0,07	2,39 ± 0,10	3,39 ± 0,03	3,54 ± 0,07	
D	VRS	0,05 µg de subunidad F	4,07 ± 0,16	5,15±0,11 5,24±0,08	1,98 ± 0,10	3,03 ± 0,07	3,28 ± 0,08	
E	VRS	5 µg de subunidad F/MF59	3,99 ± 0,16	5,59±0,15 5,72±0,09	1,98 ± 0,26	3,34 ± 0,34	3,38 ± 0,10	
F	VRS	0,5 µg de subunidad F/MF59	4,00 ± 0,30	5,55±0,11 5,78±0,12	2,04 ± 0,12	3,40 ± 0,09	3,39 ± 0,20	
G	VRS	0,05 µg de subunidad F/MF59	3,96 ± 0,20	5,61 ± 0,09 5,66±0,09	1,85 ± 0,37	3,32 ± 0,08	3,64 ± 0,15	
H	VRS	5 µg de subunidad F/alum	4,02 ± 0,10	5,46±0,14 5,63±0,06	1,75 ± 0,13	3,45 ± 0,09	3,31 ± 0,17	
I	VRS	0,5 µg de subunidad F/alum	3,91 ± 0,19	5,22±0,14 5,57±0,14	2,05 ± 0,19	3,23 ± 0,14	3,52 ± 0,02	
J	VRS	0,05 µg de subunidad F/alum	4,04 ± 0,11	5,06±0,13 5,35±0,16	2,22 ± 0,15	3,16 ± 0,17	3,54 ± 0,10	
K	-	-	0,70	0,70 0,70	1,00	1,00	1,00	

Abreviaturas: Gr - grupo, sem - semana

^a 1x10⁶ ufp de VSR i.n.^b i.m.^c promedio del log₁₀ títulos ± desviación estándar de 7 animales individuales por grupo (2 animales en el Gr. K)^d promedio del log₁₀ de títulos ± intervalo de 2 combinaciones de 3-4 animales por grupo (1 combinación de 2 animales en el Gr. K)

Ejemplo 3: Protección mediante transferencia pasiva de anticuerpos derivados de ratas del algodón y ratones infectados con VRS reforzados con vacuna de la subunidad F

1. Procedimientos

Transferencia sérica e infección por el VSR de ratas del algodón y ratones

5 Las ratas algodón hembra (*Sigmodon hispidis*) se obtuvieron de los Harlan Laboratories y los ratones BALB/c hembra se obtuvieron de Charles River Laboratories. Todos los estudios fueron aprobados y se realizaron de acuerdo con el Novartis Animal Care and Use Committee. Grupos de 7-8 ratas del algodón hembras adultas se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) (10 ml/kg) con de una a tres combinaciones de suero de rata del algodón sin diluir: 1) "normal" -
10 ratas del algodón no expuestas a tratamiento recogidas, 2) "VSR" - ratas del algodón se infectaron con 1×10^5 ufp de VSR y el suero se recogió 7 semanas después, o 3) "VSR + subunidad" - las ratas del algodón se infectaron con 1×10^5 ufp de VSR y se vacunaron 7 semanas después con la subunidad F. El suero se recogió de 2 a 4 semanas después de la vacunación con la subunidad F (combinado de animales vacunados con 0,05 μ g, 0,5 μ g, o 5 μ g de subunidad F, sin adyuvante, o bien con adyuvante de alum o MF59, análogamente al experimento con ratas del algodón descrito en el Ejemplo 2). Un grupo adicional de animales se inyectó con 10 ml/kg de una dilución 1:3 de la combinación sérica
15 "VSR + subunidad".

Grupos de 4-8 ratones BALB/c se inocularon i.p. (20 ml/kg) con una de dos combinaciones de suero de ratón no diluido: 1) "normal" - recogido de ratones BALB/c no expuestos a tratamiento, o 2) "VSR + subunidad" - BALB/c se infectaron con 1×10^6 ufp de VSR y se vacunaron 7 y 11 semanas después con la subunidad F. El suero se recogió de
20 2 a 4 semanas después de la 1ª vacunación y 2 semanas después de la 2ª vacunación y se combinaron (los animales se vacunaron con 0,05 μ g, 0,5 μ g, o 5 μ g de subunidad F, sin adyuvante, o bien con adyuvante de alum o MF59, análogamente al experimento con ratones descrito en el Ejemplo 2). Un grupo adicional de ratones se inyectó con 20 ml/kg de una dilución 1:3 de la combinación sérica "VSR + subunidad".

Dos días después de la transferencia de suero a todas las ratas del algodón y ratones, junto con los animales de control no tratados, se infectaron por vía intranasal con VSR (1×10^5 ufp para las ratas del algodón y 3×10^6 ufp para los
25 ratones).

Ensayo de VSR en placas

La carga de VSR en el pulmón tras la infección se determinó por ensayos en placas. Los pulmones se recogieron y se pasaron 4 días (ratones) o 5 días (ratas del algodón) después de la infección por VRS y un lóbulo derecho se introdujo en medio con un 25 % de sacarosa y se perturbó con un homogeneizador de tejido. Los sobrenadantes
30 exentos de células de estas muestras se almacenaron a -80 °C. Para analizar la presencia i virus infecciosos, diluciones del homogenado pulmonar clarificado (en PBS con un 5 % de HI-FBS) se inocularon sobre monocapas de células Hep-2 confluentes en un volumen de 200 μ l/pocillo de una placa de 12 pocillos. Después de 2 horas con agitación de vaivén periódica suave (37 °C, CO₂ al 5 %), el inóculo se eliminó, y las células se superpusieron con 1,5 ml de agarosa SeaPlaque al 1,25 % en medio suplementado con un 5 % de HI-FBS, glutamina, y antibióticos.
35 Después de 3-4 días de incubación, las células se volvieron a superponer con 1 ml de agarosa SeaPlaque al 1,25 % en medio que contenía rojo negro al 0,1 % (Sigma). Las placas se contaron un día después con ayuda de una caja de luz. Si la carga vírica de un animal individual estaba por debajo del límite de detección del ensayo (~200 ufp/g de pulmón), se le asignó un título de 100 ufp/g de pulmón para el fin de calcular la media del grupo.

Ensayo de neutralización del VSV e IgG específica de F según ELISA

40 Estos ensayos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2.

2. Resultados y conclusiones

Para modelar la protección de bebés humanos mediante la transferencia pasiva de anticuerpos con un aumento de títulos neutralizantes procedentes de sus madres anteriormente infectadas por el VSR y con refuerzo de la subunidad F, los inventores infectaron ratas del algodón adultas con VSR, algunas de ellas recibieron un refuerzo con la vacuna
45 de subunidad VSR F 7 semanas después, se recogió el suero, y el suero se inyectó i.p. a ratas del algodón o ratones adultos no infectados por VSR no inmunizados (4-8 animales por grupo, el suero de ratas del algodón se inyectó a ratas del algodón, y el suero de ratón se inyectó a ratones). Dos días después de la transferencia de suero, todos los animales se estimularon con VSR i.n.

La actividad neutralizante del VSR se podría detectar fácilmente en el suero de roedores receptores un día después de la transferencia pasiva de suero del donante (Tablas 3 y 4). Los roedores que recibieron suero de donantes infectados por el VSR inmunizados con la vacuna de la subunidad F tuvieron los títulos de neutralización del RSV séricos más altos después de la transferencia y la carga vírica más baja en el pulmón después del desafío con el VSR, cuando se comparan con los roedores que recibieron suero de donantes infectados por el VRS pero no inmunizados, suero normal, o no recibieron suero antes del estímulo con el VRS (Tablas 3 y 4). Estos datos ilustran que el suero
50 transferido pasivamente puede proteger del estímulo con el VRS, y que cuanto mayor sea el título de neutralización del suero transferido, mayor será la protección contra el VRS (Tablas 3 y 4 y Figs. 1A y 1B). Puesto que los receptores
55

de suero transferido de ratas del algodón infectadas con el VRS inmunizadas con la vacuna de la subunidad F, pero no de ratas del algodón infectadas con el VRS pero no inmunizadas con la vacuna de la subunidad F, quedaron protegidas del estímulo con el VRS, estos resultados respaldan la protección de los bebés humanos nacidos de mujeres embarazadas (que inevitablemente han sufrido infecciones por el VRS en el pasado) inmunizadas con la vacuna de subunidad VRS F.

Para determinar la semivida del anticuerpo específico del VRS después de la transferencia pasiva, grupos de roedores recibieron inyecciones i.p. con suero no diluido de roedores infectados con el VRS inmunizadas con la vacuna de la subunidad F, y el título de neutralización del VRS en los receptores se midió en varios puntos temporales posteriormente. Los resultados de estos estudios demuestran que la semivida de los anticuerpos transferidos de forma pasiva fue aproximadamente de 2 semanas tanto en las ratas del algodón como en los ratones (Tablas 5 y 6). Por lo tanto, cada dos veces de aumento en el título de neutralización por encima del umbral de protección por la vacuna de la subunidad VRS F debería extender la protección en los receptores del anticuerpo pasivo en 2 semanas, en estos modelos de roedores.

Tabla 3: Protección mediante la transferencia pasiva de suero procedente de ratas del algodón infectadas con el VRS inmunizadas con la vacuna de la subunidad F

Gr.	Suero transferido ^a (día 0)	Estím. ^b (día 2)	1 día después de la transferencia de suero		5 días después del estímulo con el VRS
			Título de IgG específico de F ^c	Título de neutralización de VRS sérico ^d	Carga vírica del pulmón ^e
A	VRS + subunidad	VRS	2,81 ± 0,09	2,52 ± 0,09	3,18 ± 0,42
B	1:3 VRS + subunidad	VRS	2,43 ± 0,30	2,16 ± 0,12	5,36 ± 0,47
C	VRS	VRS	1,64 ± 0,05	1,92 ± 0,15	5,48 ± 0,23
D	normal	VRS	0,70 ± 0,00	1,04 ± 0,12	5,82 ± 0,24
E	-	VRS	0,70 ± 0,00	1,00 ± 0,00	5,74 ± 0,35

Abreviaturas: Gr - grupo, estím.- estímulo

^a suero combinado de ratas del algodón infectadas con el VRS inmunizadas con la vacuna de la subunidad ("VRS + subunidad"), no vacunadas ("VRS"), o no expuestas al tratamiento ("normal"). 10 ml/kg de suero no diluido o diluido 1:3, como se indica, se inyectó i.p. en grupos de ratas del algodón receptoras.

^b 1x10⁵ ufp de VRS i.n.

^{c-d} promedio del log₁₀ del título ± desviación estándar de 7-8 animales individuales por grupo

^e promedio del log₁₀ ufp/g pulmón ± desviación estándar de 7-8 animales individuales por grupo

Tabla 4: Protección mediante la transferencia pasiva de suero procedente de ratones BALB/c infectados con el VRS inmunizados con la vacuna de la subunidad F

Gr.	Suero transferido ^a (día 0)	Estím. ^b (día 2)	1 día después de la transferencia de suero		4 días después del estímulo con el VRS
			Título de IgG específico de F ^c	Título de neutralización de VRS sérico ^d	Carga vírica del pulmón ^e
A	VRS + subunidad	VRS	4,85 ± 0,04	2,90 ± 0,06	2,65 ± 0,07
B	1:3 VRS + subunidad	VRS	4,30 ± 0,05	2,20 ± 0,20	4,78 ± 0,39
D	normal	VRS	0,70 ± 0,00	1,00 ± 0,00	4,95 ± 0,37
E	-	VRS	0,70 ± 0,00	1,04 ± 0,11	4,96 ± 0,26

Abreviaturas: Gr - grupo, estím.- estímulo

^a suero combinado de ratones BALB/c infectados con el VRS reforzados con la vacuna de la subunidad F ("VRS + subunidad") o no expuestos al tratamiento ("normal"). 20 ml/kg de suero no diluido o diluido 1:3, como se indica, se inyectó i.p. a grupos de ratones receptoras.

^b 3x10⁶ ufp de VRS i.n.

^{c-d} promedio del log₁₀ del título ± desviación estándar de 4-8 animales individuales por grupo

^e promedio del log₁₀ ufp/g pulmón ± desviación estándar de 4-8 animales individuales por grupo

Tabla 5: Disminución de los títulos de neutralización del VRS en suero en ratas del algodón receptoras de anticuerpos pasivos

Día después de la transferencia ^a	Título de neutralización de VRS sérico ^b	Semivida
1	2,51 ± 0,00	
7	2,27 ± 0,01	
14	2,24 ± 0,05	
19	2,11 ± 0,14	
34	1,84 ± 0,08	
48	1,47 ± 0,06	15 días

^a10 ml/kg de suero combinado no diluido de ratas del algodón infectadas con el VRS inmunizadas con la vacuna de la subunidad F ("VRS + subunidad") se inyectaron i.p. a un grupo de 8 ratas del algodón
^b promedio del log₁₀ título ± intervalo de 2 combinaciones de 4 animales

Tabla 6: Disminución de los títulos de neutralización del VRS en suero en ratones receptores de anticuerpos pasivos

Día después de la transferencia ^a	Título de neutralización de VRS sérico ^b	Semivida
1	2,87 ± 0,01	
9	2,65 ± 0,04	
16	2,43 ± 0,03	
23	2,26 ± 0,08	
36	2,08 ± 0,02	
44	1,83 ± 0,04	14 días

^a20 ml/kg de suero combinado no diluido de ratones BALB/c infectados con el VRS inmunizados con la vacuna de la subunidad F ("VRS + subunidad") se inyectaron i.p. a un grupo de 13 ratones BALB/c.
^b promedio del log₁₀ título ± SEM de 2-3 combinaciones de 4-5 animales

5 Ejemplo 4: Inducción de una respuesta inmunitaria protectora mediante la vacuna RSV SAM™ en roedores en presencia o ausencia de suero inmunitario del VRS transferido de forma pasiva

1. Procedimientos

Vacuna RSV SAM™

En estos estudios se usó una vacuna RSV SAM™ (Mensaje de autoamplificación) (vacuna del replicón de ARN) que codificaba la proteína VRS F de longitud completa con una delección en la región del péptido de fusión. El ARN se formuló con una nanoemulsión catiónica (CNE, 4,4 mg/ml DOTAP, SPAN 85 al 0,5 %, Tween 80 al 0,5 %, escualeno al 4,3 % en un tampón citrato 10 M pH 6,5 en fase acuosa) antes de la inyección. La CNE se preparó análogamente a la MF59 cargada anteriormente descrita (Ott y col., Journal of Controlled Release, volumen 79, páginas 1-5, 2002), con una modificación principal. DOTAP se disolvió directamente en el escualeno, y no se utilizó ningún disolvente orgánico.

El ARN se diluyó a una concentración de 300 µg/ml en un tampón citrato 2 M que contenía NaCl 20 M y sacarosa 560 M. El ARN se añadió directamente en un volumen equivalente de CNE con vortización suave. La solución se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la complejación, la solución resultante se diluyó hasta la concentración adecuada y se utilizó en el plazo de 1 hora.

Transferencia de suero, vacunación, e infección de los roedores por el VRS

Suero puro o una dilución 1:3 de suero procedentes de ratas del algodón hembra que se habían infectado con el VRS y habían recibido un refuerzo con la vacuna VRS SAM se ha inyectó i.p. (10 mg/kg) a grupos de 16 ratas del algodón adultas no inmunizadas no expuestas al VRS. Grupos de ratas del algodón del control se inyectaron i.p. con suero de rata del algodón normal sin diluir o se dejaron sin tratamiento. La mitad de los animales de cada grupos se vacunaron i.m. con 15 µg de la vacuna RSV SAM (100 µl de volumen total en 1 extremidad posterior) los días 2 y 20 del estudio. Todas las ratas del algodón se estimularon i.n. con 1x10⁵ ufp de VRS el día 49, y 5 días después, los bazos y los pulmones se recogieron para el análisis de linfocitos T y carga vírica. Se realizó un estudio similar con ratones BALB/c con transferencia pasiva de suero de ratón inmunizado con VRS o normal seguido por vacunación de un subconjunto de cada grupo con 15 µg de la vacuna VRS SAM (100 µl de volumen total dividido entre 2 extremidades posteriores), salvo que la dosis de suero fue 20 ml/kg, las vacunas VRS SAM se administraron los días 2 y 22, los grupos incluyeron 5 animales adicionales, cuyos bazos se recogieron el día 36 para el análisis de linfocitos T específicos de F, ratones

se estimularon con 3×10^6 ufp del VRS el día 45, y los pulmones y bazos se recogieron el día 49. Las combinaciones de suero de rata del algodón y de ratón usados para la transferencia en estos estudios fueron idénticos a los utilizados en el Ejemplo 3.

Ensayo de neutralización del VSV e IgG específica de F según ELISA

5 Estos ensayos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2.

Ensayo de VRS en placas

Este ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 3.

Ensayo de linfocitos T funcionales en rata del algodón: ELISA celular para citoquinas secretadas

10 La secreción de IFN γ e IL-4 específica de antígeno en las ratas del algodón se midió mediante ELISA usando kits de R&D Systems con las siguientes modificaciones del protocolo. Los esplenocitos ($3-4 \times 10^5$ células vivas nucleadas) en 200 μ l de medio de linfocitos T exento de suero (RPMI, 10 M HEPES, aminoácidos no esenciales 100 μ M, 2-mercaptoetanol 50 μ M, y antibióticos) se añadieron a placas revestidas con anticuerpo de captura de citoquinas. Las células se estimularon con un cóctel de 5 μ M cada uno de los tres péptidos de VRS F (F29-43, F49-63 y F247-261).
15 Los patrones de citoquina recombinante se diluyeron en medio de linfocitos T + 1 % FBS. Después de 24 horas, las citoquinas secretadas se detectaron según las recomendaciones del fabricante. Los resultados se notifican como pg puros/ml (promedio de pocillos por triplicado con estímulo - promedio de pocillos sin estímulo por triplicado).

Ensayo de linfocitos T funcionales en ratón: tinción de citoquinas intracelulares y citometría de flujo

20 Los bazos se recogieron en los días del estudio indicados y se procesaron a suspensiones monocelulares. Cuando los esplenocitos de los animales individuales se analizaron por separado, se establecieron 1 cultivo estimulado con antígeno y un cultivo no estimulado para cada animal, y cuando los esplenocitos de todos los animales de un grupo se combinaron y se analizaron en combinación, se establecieron 2 cultivos estimulados con antígeno y dos cultivos no estimulados para cada combinación. Los cultivos estimulados con antígeno contenían 1×10^6 esplenocitos, los péptidos 85-93 de VRS F y 249-258 (cada uno a 1 M), los péptidos de VRS F 51-66, 164-178, y 309-323 ((cada uno a 5 M), mAb contra CD28 (1 μ g/ml), y Brefeldina A (1:1000). Los cultivos no estimulados no contenían los péptidos VRS F, y por otra parte fueron idénticos a los cultivos estimulados. Tras cultivar durante 6 horas a 37 °C, los cultivos se procesaron para la inmunofluorescencia. Las células se lavaron y posteriormente se tiñeron con anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra CD4 y CD8 marcados fluorescentemente. Las células se lavaron de nuevo y después se fijaron con Cytofix/Cytoperm durante 20 minutos. A continuación, las células fijadas se lavaron con tampón de lavado Perm y después se tiñeron con mAb marcados fluorescentemente específicos de IFN γ , TNF α , IL-2 y IL-5.
30 La células teñidas se lavaron y después se analizaron en un citómetro de flujo LSR II. El programa informático FlowJo se usó para analizar los datos adquiridos. Los subconjuntos de linfocitos T CD4+8- y CD8+4- se analizaron por separado. Para cada subconjunto de una muestra dada, se determinó el porcentaje de células positivas para las citoquinas. El porcentaje de linfocitos T específicos de antígeno VRS F se calculó como la diferencia entre el % de células positivas para la citoquina en los cultivos estimulados con antígeno y el porcentaje de células positivas para la citoquina en los cultivos no estimulados.
35

2. Resultados y conclusiones

40 Para modelar el uso de la vacuna VRS SAM en bebés no expuestos al VRS, los inventores evaluaron la inmunogenicidad y la eficacia de la vacuna VRS SAM en ratas del algodón y ratones no expuestos al RSV. La vacuna VRS SAM fue inmunogénica en ambas especies, desencadenando títulos de neutralización del suero VRS de 1:776 en ratas del algodón y 1:209 en ratones, cuando se midió 3-4 semanas después de la 2ª vacunación i.m. de 15 μ g de la vacuna VRS SAM (Tabla 7 y 8, grupos H). En ratones, la vacuna VRS SAM desencadenó una sólida respuesta de linfocitos T CD8+ específica de F y una respuesta de linfocitos T Th1 CD4+ moderada, caracterizada por la producción de IFN γ , TNF α , e IL-2 sin una producción significativa de IL-5 (Tabla 9, grupo H). En ambas especies, la vacuna de ARN VRS SAM proporcionó una protección casi completa frente a un estímulo nasal con el VRS administrado 3-4
45 semanas después de la 2ª vacunación con el ARN, como se puede apreciar por una reducción mayor del 99,9 % en las cargas víricas pulmonares, en comparación con los animales del control sin inmunizar (Tablas 7 y 8, grupo H comparado con el grupo D).

50 Los anticuerpos neutralizantes del VRS se transfirieron pasivamente de la madre a la cría a través de la placenta y protegió a las crías de la enfermedad del VRS grave durante los primeros meses de vida; sin embargo, estos mismos anticuerpos también pueden interferir con la respuesta inmunitaria activa contra la vacuna VRS SAM. Por tanto, los inventores también investigaron si la inmunogenicidad y la eficacia de la vacuna VRS SAM en roedores se afectaba mediante los anticuerpos específicos del VRS adquiridos de forma pasiva. Las respuestas de IgG neutralizantes del VRS y específicas de F se pudieron detectar rápidamente en el suero de roedores receptores un día después de la transferencia pasiva de suero puro o diluido 1:3 procedente de roedores infectados por el VRS que recibieron un
55 refuerzo de vacuna de la subunidad VRS F (Tablas 7-8). Cuarenta y ocho días después de transferir el suero de inmunidad contra el VRS, los títulos de neutralización del VRS cayeron a niveles muy bajos o indetectables en ratas del algodón receptoras no vacunadas, pro fueron >1:50 en las vacunadas con ARN (Tabla 7, grupos A y B en

comparación a los grupos E y F). Estos datos demuestran que la vacuna VRS SAM fue capaz de inducir una respuesta neutralizante del VRS en presencia de suero inmunitario transferido de forma pasiva. Sin embargo, la respuesta neutralizante inducida por la vacuna VRS SAM fue aproximadamente 10 veces menos en presencia de anticuerpo específico del VRS pasivo que en ausencia de este anticuerpo (Tabla 7, grupos E y F en comparación con los grupos G y H). En ratones Balb/c, los títulos neutralizantes de VRS medidos después de la segunda vacunación con VRS SAM fueron similares en presencia o ausencia de anticuerpo específico del VRS transferido de forma pasiva (Tabla 8, grupos E y F en comparación con los grupos G y H). Aunque estos datos sugieren que el anticuerpo transferido de forma pasiva no inhibe la respuesta de anticuerpos inducida por la vacuna VRS SAM en ratones, se deberá indicar que el título de neutralización 44 días después de la transferencia de suero en ratones vacunados con VRS SAM era una combinación del título inducido por la vacuna VRS SAM y el que quedaba derivado de la transferencia pasiva (el anticuerpo neutralizante seguía detectándose en los ratones no vacunados en este punto temporal). Por lo tanto, es probable que el anticuerpo específico del VRS transferido de forma pasiva inhiba la respuesta de anticuerpos inducida por la vacuna VRS SAM en cierta medida en los ratones también.

Aunque el anticuerpo específico del VRS transferido de forma pasiva suprimió parcialmente la respuesta de anticuerpos inducida por VRS SAM en roedores, no suprime la respuesta de los linfocitos T inducida por VRS SAM. En las ratas del algodón, la magnitud de la respuesta de IFN γ específica de F esplénica 5 días después de la infección por el VRS fue equivalente en animales vacunados con VRS SAM independientemente de si los animales habían recibido o no una dosis con suero antes de la vacunación (Tabla 10, grupo E en comparación con H). Los resultados fueron similares en los ratones, donde las respuestas de T CD4+ y CD8+ esplénicas específicas de F medidas 14 días después de la segunda vacunación con VRS SAM, o 4 días después de la segunda vacunación con VRS SAM fueron equivalentes en presencia o ausencia de suero transferido de forma pasiva (Tablas 9 y 11, grupo E en comparación con G y H).

Para determinar si la vacuna VRS SAM era capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora en presencia de anticuerpo pasivo procedente de donantes infectados por el VRS que recibieron un refuerzo con la vacuna de la subunidad F, las ratas del algodón o los ratones se inocularon con el suero de inmunidad contra el VRS, se vacunaron dos veces con la vacuna VRS SAM, y después se infectaron con el VRS 3-4 semanas después. De cuatro a cinco días después de la infección, la carga vírica pulmonar de estos animales fue al menos 1,4 log₁₀ menor que en los animales del control que no recibieron suero o ARN antes de la infección por el VRS (Tablas 7 y 8, grupos E y F en comparación con D). Puesto que el anticuerpo transferido de forma pasiva se había metabolizado en ese momento y, por tanto, que ya no protegían los animales del estímulo con el VRS (Tablas 7 y 8, grupos A y B), cualquier efecto protector se puede atribuir a la vacuna VRS SAM. Estos datos demuestran, por tanto, que la vacuna VRS SAM es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora en presencia del anticuerpo específico del VRS transferido de forma pasiva. Sin embargo, la eficacia protectora de la vacuna VRS SAM fue mayor en ausencia de suero específico del VRS pasivo (Tablas 7 y 8, grupos G y H).

En conclusión, estos resultados respaldan el uso de la vacuna VRS SAM en niños nacidos de madres vacunadas con la vacuna de subunidad VRS F, ya que proporcionan una evidencia preclínica en dos modelos en roedor de que la vacuna VRS SAM es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora en presencia del anticuerpo específico del VRS transferido de forma pasiva. Aunque la respuesta de neutralización del VRS inducida por la vacuna VRS SAM quedaba suprimida en parte por el anticuerpo pasivo, la respuesta de los linfocitos T no quedaba y, por tanto, el posible mecanismo de protección era la inmunidad mediada por células.

Como se resume en la tabla 12, los datos de los Ejemplos 2-4 respaldan la estrategia de doble vacunación con el VRS; solamente aquellas ratas del algodón que recibieron una dosis de suero de donantes infectados por el VRS inmunizados con la vacuna de la subunidad F en el día 0, y posteriormente vacunados con la vacuna VRS SAM los días 2 y 20, quedaron protegidos de un estímulo temprano (día 2) y tardío (día 49) con el VRS.

Tabla 7: Inmunogenicidad y eficacia de la vacuna VRS SAM en ratas del algodón en presencia o ausencia de anticuerpo específico del VRS transferido de forma pasiva

Gr.	Transferencia de suero a (d 0)	Vacc. ^b (d 2 y 20)	Estim. ^c (d 49)	Título de IgG específico de F sérico ^d				Título de neutralización de VRS sérico ^e				Carga vírica del pulmón ^f
				1 d después de la transf. de suero (d 1)	17 d después de la 1ª vacc. (d 19)	28 d después de la 2ª vacc. (d 48)	5 d después del estím. con el VRS (d 54)	1 d después de la transf. de suero (d 1)	17 d después de la 1ª vacc. (d 19)	28 d después de la 2ª vacc. (d 48)	5 d después del estím. con el VRS (d 54)	
A	VRS + subunidad	-	VRS	2,94 ± 0,07	2,23 ± 0,06	0,70 ± 0,00	0,70 ± 0,00	2,51 ± 0,00	2,11 ± 0,14	1,47 ± 0,06	1,73 ± 0,14	4,90 ± 0,39
B	1:3 VRS + subunidad	-	VRS	2,36 ± 0,06	1,67 ± 0,06	0,70 ± 0,00	0,70 ± 0,00	2,09 ± 0,01	1,73 ± 0,09	1,17 ± 0,17	1,72 ± 0,13	4,82 ± 0,39
C	normal	-	VRS	0,70 ± 0,00	0,70 ± 0,00	0,70 ± 0,00	0,70 ± 0,00	1,17 ± 0,17	1,20 ± 0,20	1,16 ± 0,16	1,93 ± 0,17	5,42 ± 0,25
D	-	-	VRS	0,70 ± 0,00	0,70 ± 0,00	0,70 ± 0,00	0,70 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,69 ± 0,14	5,17 ± 0,35
E	VRS + subunidad	VRS SAM	VRS	2,83 ± 0,09	2,14 ± 0,16	2,03 ± 0,30	2,42 ± 0,30	2,44 ± 0,02	1,91 ± 0,04	1,86 ± 0,10	2,23 ± 0,09	3,82 ± 0,42
F	1:3 VRS + subunidad	VRS SAM	VRS	2,34 ± 0,08	2,02 ± 0,22	2,75 ± 0,33	2,99 ± 0,28	2,09 ± 0,04	1,79 ± 0,05	1,73 ± 0,15	2,37 ± 0,01	3,68 ± 0,72
G	normal	VRS-SAM	VRS	0,70 ± 0,00	3,14 ± 0,19	3,52 ± 0,19	3,67 ± 0,14	1,00 ± 0,00	2,36 ± 0,13	3,06 ± 0,02	3,18 ± 0,01	2,18 ± 0,19
	H	VRS-SAM	VRS	0,70 ± 0,00	3,32 ± 0,11	3,40 ± 0,21	3,48 ± 0,27	1,00 ± 0,00	2,58 ± 0,11	2,89 ± 0,15	3,00 ± 0,22	2,12 ± 0,17

Abreviaturas: Gr - grupo, d - día, trans - transferencia, vacc - vacunación, estím. - estímulo
^a suero combinado de ratas del algodón infectadas con el VRS inmunizadas con la vacuna de la subunidad ("VRS + subunidad"), o no expuestas al tratamiento ("normal"). 10 ml/kg de suero no diluido o diluido 1:3, como se indica, se inyectó i.p. a grupos de ratas del algodón receptoras
^b 15 µg de vacuna VRS SAM i.m. o sin vacunación
^c 1x10⁵ ufp de VRS i.n.
^d promedio del log₁₀ del título ± desviación estándar de 7-8 animales individuales por grupo
^e promedio del log₁₀ título ± intervalo de 2 combinaciones de 3-4 animales por grupo
^f promedio del log₁₀ ufp/g pulmón ± desviación estándar de 7-8 animales individuales por grupo

Tabla 8: Inmunogenicidad y eficacia de la vacuna de ARN de VRS SAM en ratones BALB/ C en presencia o ausencia de anticuerpo específico del VRS transferido de forma pasiva

Gr.	Grupo de transf. ^a (d 0)	Vacc. ^b (d 2 y 22)	Estim. ^c (d 45)	Título de IgG específico de F sérico ^d				Título de neutralización de VRS sérico ^e				Carga vírica del pulmón ^f 4 d después del estim. con el VRS (d49)
				1 d después de la transf. de suero (d 1)	1 d después de la 2 ^a vacc. (d 23)	22 d después de la 2 ^a vacc. (d 44)	4 d después del estim. con el VRS (d 49)	1 d después de la transf. de suero (d 1)	1 d después de la 2 ^a vacc. (d 23)	22 d después de la 2 ^a vacc. (d44)	4 d después del estim. con el VRS (d 49)	
A	VRS + subunidad	-	VRS	4,88 ± 0,06	4,30 ± 0,07	3,69 ± 0,32	3,98 ± 0,06	2,87 ± 0,01	2,26 ± 0,08	1,83 ± 0,04	1,86 ± 0,01	4,91 ± 0,24
B	1:3 VRS + subunidad	-	VRS	4,28 ± 0,16	3,67 ± 0,14	3,29 ± 0,19	3,18 ± 0,22	2,39 ± 0,02	1,78 ± 0,04	1,44 ± 0,01	1,54 ± 0,01	5,02 ± 0,31
C	normal	-	VRS	0,07 ± 0,00	n.p.	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,16 ± 0,16	5,14 ± 0,40
D	-	-	VRS	0,07 ± 0,00	n.p.	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	5,21 ± 0,42
E	VRS + subunidad	VRS SAM	VRS	4,88 ± 0,05	4,16 ± 0,08	3,70 ± 0,09	3,46 ± 0,12	2,95 ± 0,08	2,12 ± 0,11	2,47 ± 0,11	2,62 ± 0,15	3,58 ± 0,46
F	1:3 VRS + subunidad	VRS SAM	VRS	4,34 ± 0,04	3,61 ± 0,05	3,20 ± 0,03	3,17 ± 0,08	2,41 ± 0,12	1,73 ± 0,11	2,01 ± 0,07	2,03 ± 0,14	3,12 ± 0,47
G	normal	VRS SAM	VRS	0,07 ± 0,00	3,55 ± 0,42	4,38 ± 0,55	4,29 ± 0,53	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,85 ± 0,13	2,24 ± 0,22	2,11 ± 0,22
	-	VRS SAM	VRS	0,07 ± 0,00	3,35 ± 0,90	4,11 ± 0,40	3,98 ± 0,37	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	2,32 ± 0,12	2,18 ± 0,40	2,10 ± 0,18

Abreviaturas: Gr - grupo, d - día, trans - transferencia, vacc - vacunación, estim. - estímulo, n.p. - no ensayado

^a suero combinado de ratones infectados con el VRS reforzados con la vacuna de la subunidad F ("VRS + subunidad") o no expuestos al tratamiento ("normal"). 20 ml/kg de suero no diluido o diluido 1:3, como se indica, se inyectó i.p. a grupos de ratones receptores

^b 15 µg de vacuna VRS SAM i.m. o sin vacunación

^c 3x10⁶ ufp de VRS i.n.

^d promedio del log₁₀ del título ± desviación estándar de 8-13 animales individuales por grupo

^e promedio del log₁₀ título ± intervalo de 2 combinaciones de 2-3 combinaciones de 3-4 animales por grupo

^f promedio del log₁₀ ufp/g pulmón ± desviación estándar de 8 animales individuales por grupo

Tabla 9: Respuestas de linfocitos T específicas de F inducidas por la vacuna VRS SAM en ratones BALB/c en presencia o ausencia de anticuerpo específico del VRS transferido de forma pasiva

Gr.	Grupo de transf. de suero ^a . (d 0)	Vacc. ^b (d2 y 22)	Estim. ^c (d 45)	% Citocquina* específica de F por CD4 ⁺ 14 días después de la 2 ^a vacc. (d 36)							
				IFN γ	TNF α	IL-2	IL-5	IFN γ	TNF α	IL-2	IL-5
A	VRS + subunidad	-	VRS	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,02 ± 0,02
B	1:3 VRS + subunidad	-	VRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
C	normal	-	VRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
D	-	-	VRS	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,03
E	VRS + subunidad	VRS SAM	VRS	0,08 ± 0,05	0,12 ± 0,08	0,12 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,77 ± 0,50	0,69 ± 0,42	0,17 ± 0,10	0,01 ± 0,02
F	1:3 VRS + subunidad	VRS SAM	VRS	0,07 ± 0,02	0,16 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,01 ± 0,01	1,11 ± 0,62	1,00 ± 0,64	0,27 ± 0,06	0,01 ± 0,01
G	normal	VRS SAM	VRS	0,04 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,00 ± 0,01	1,16 ± 0,30	1,06 ± 0,25	0,26 ± 0,09	0,03 ± 0,03
H	-	VRS SAM	VRS	0,05 ± 0,03	0,12 ± 0,05	0,12 ± 0,06	0,01 ± 0,01	2,47 ± 1,55	2,24 ± 1,38	0,51 ± 0,33	0,01 ± 0,02

Abreviaturas: Gr - grupo, d - día, vacc - vacunación, estim. - estímulo, n.p. - no ensayado

^a suero combinado de ratones infectados con el VRS reforzados con la vacuna de la subunidad F ("VRS + subunidad") o no expuestos al tratamiento ("normal"). 20 ml/kg de suero no diluido o diluido 1:3. como se indica, se inyectó i.p. a grupos de ratones receptores

^b 15 µg de vacuna VRS SAM i.m. o sin vacunación

^c 3x10⁶ ufp de VRS i.n.

^d-promedio del% respuestas del título ± desviación estándar de 4-5 animales individuales por grupo

Tabla 10: Respuestas de linfocitos T específicas de F tras el estímulo con el VRS de ratas del algodón vacunadas con la vacuna VRS SAM en la presencia o ausencia de anticuerpo específico del VRS transferido de forma pasiva

Gr.	Transferencia de suero ^a (d 0)	Vacc. ^b (d 2 y 20)	Estim. ^c (d 49)	Citoquina secretada específica de F 5 días después del estim. con el VRS (d 54) ^d	
				IFN γ	IL-4
A	VRS + subunidad	-	VRS	342 \pm 138	2,6 \pm 0,8
B	1:3 VRS + subunidad	-	VRS	1412 \pm 404	3,0 \pm 0,8
C	normal	-	VRS	176 \pm 45	1,0 \pm 0,6
D	-	-	VRS	860 \pm 187	0,6 \pm 0,6
E	VRS + subunidad	VRS SAM	VRS	2941 \pm 482	5,4 \pm 0,2
F	1:3 VRS + subunidad	VRS SAM	VRS	2505 \pm 606	3,4 \pm 0,7
G	normal	VRS SAM	VRS	4444 \pm 1224	5,0 \pm 2,8
H	-	VRS SAM	VRS	3011 \pm 461	2,8 \pm 1,4

Abreviaturas: Gr - grupo, d - día, vacc - vacunación, estim.- estímulo

^a suero combinado de ratas del algodón infectadas con el VRS reforzadas con la vacuna de la subunidad ("VRS + subunidad"), o no expuestas al tratamiento ("normal"). 10 ml/kg de suero no diluido o diluido 1:3, como se indica, se inyectó i.p. a grupos de ratas del algodón receptoras

^b 15 μ g de vacuna VRS SAM i.m. o sin vacunación

^c 1×10^5 ufp de VRS i.n.

^d promedio pg puro/ml \pm error estándar del promedio de 4-5 animales individuales (bazos) por grupo

Tabla 11: Respuestas de linfocitos T específicas de F tras el estímulo con el VRS de ratones BALB/c vacunados con la vacuna VRS SAM en la presencia o ausencia de anticuerpo específico del VRS transferido de forma pasiva

Gr.	Transferencia de suero ^a (d 0)	Vacc. ^b (d 2 y 22)	Estim. ^c (d 45)	% Citocina ⁺ específica de F por CD4 ⁺ 4 días después de la infección por el VRS (d 49)									
				IFN γ	TNF α	IL-2	IL-5	IFN γ	TNF α	IL-2	IL-5		
A	VRS + subunidad	-	VRS	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,02	-0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,02	0,00 ± 0,03	0,01 ± 0,03	0,02 ± 0,02		
B	1:3 VRS + subunidad	-	VRS	0,00 ± 0,00	-0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,04	0,00 ± 0,03	0,02 ± 0,02		
C	Normal	-	VRS	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,02	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,03	0,00 ± 0,04	-0,01 ± 0,03	0,00 ± 0,02		
D	-	-	VRS	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01	-0,02 ± 0,02	-0,02 ± 0,04	0,01 ± 0,03	-0,01 ± 0,02		
E	VRS + subunidad	VRS SAM	VRS	0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,42 ± 0,09	0,26 ± 0,07	0,10 ± 0,05	0,01 ± 0,03		
F	1:3 VRS + subunidad	VRS SAM	VRS	0,03 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,38 ± 0,09	0,25 ± 0,08	0,08 ± 0,04	0,00 ± 0,02		
G	Normal	VRS SAM	VRS	0,04 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,59 ± 0,11	0,52 ± 0,10	0,16 ± 0,06	0,01 ± 0,02		
H	-	VRS SAM	VRS	0,01 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,00 ± 0,01	0,27 ± 0,08	0,25 ± 0,07	0,08 ± 0,04	0,00 ± 0,03		
I	-	-	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	-0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,01	-0,04 ± 0,04	0,00 ± 0,03	0,00 ± 0,03		

Abreviaturas: Gr - grupo, d - día, vacc - vacunación, estím. - estímulo, n.p. - no ensayado

^a suero combinado de ratones infectados con el VRS reforzados con la vacuna de la subunidad F ("VRS + subunidad") o no expuestos al tratamiento ("normal"). 20 ml/kg de suero no diluido o diluido 1:3, como se indica, se inyectó i.p. a grupos de ratones receptores

^b 15 µg de vacuna VRS SAM i.m. o sin vacunación

^c 3x10⁶ ufp de VRS i.n.

^{d-e} promedio de respuesta ± 95 % IC de dos réplicas de una combinación de 8 animales (bazos) por grupo (4 animales el en grupo I)

Tabla 12: Resumen de los resultados del modelo en rata del algodón

Tratamiento de la rata del algodón		Protección del estímulo con VSR ^c el día indicado, tal como se mide por la carga viral en el pulmón 5 días después del estímulo	
Tipo de suero transferido ^a i.p. (día 0)	Vacunación ARN ^b i.m. (días 2 y 20)	Día 2	Día 49
ninguno	ninguno	no	no
Solo VRS	ninguno	no	<i>No analizado</i>
VRS + subunidad	ninguno	sí	no
ninguno	VRS SAM	no	sí
VRS + subunidad	VRS SAM	sí	sí (pero no completo)

^a suero combinado de ratas del algodón infectadas con el VRS inmunizadas con la vacuna de la subunidad ("VRS + subunidad"), o bien no vacunadas ("VRS"). 10 ml/kg de suero no diluido se inyectó i.p. en grupos de ratas del algodón receptoras.
^b 15 µg de vacuna VRS SAM i.m. o sin vacunación
^c 1x10⁵ ufp de VRS i.n.

La divulgación anterior es una descripción general. Se puede obtener un entendimiento más completo en referencia a los siguientes ejemplos específicos, que se proporcionan solamente con fines ilustrativos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> NOVARTIS AG
- <120> RÉGIMEN DE INMUNIZACIÓN DEL VRS
- <130> PAT054473-WO-PCT
- <140>
- <141>
- 10 <150> 61/436.355
- <151> 26/01/2011
- <160> 19
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 15 <211> 574
- <212> PRT
- <213> Virus sincicial respiratorio humano
- <400> 1

ES 2 727 836 T3

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Pro Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

ES 2 727 836 T3

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Ile Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

ES 2 727 836 T3

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Met Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
 565 570

<210> 2
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Virus sincicial respiratorio humano

5

<400> 2

Met Glu Leu Leu Ile His Arg Ser Ser Ala Ile Phe Leu Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Val Asn Ala Leu Tyr Leu Thr Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Arg Gly Tyr Phe Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

ES 2 727 836 T3

Lys Glu Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

 Met Gln Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro
 100 105 110

 Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser
 115 120 125

 Ile Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asn Asn Arg Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

 Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

 Gln Met Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

 Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

 Leu Met Ser Ser Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

 Ile Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

ES 2 727 836 T3

Leu Cys Thr Thr Asn Ile Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Asp Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Ser Leu Cys Asn Thr
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Ser Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Ile Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Leu Glu Gly
 450 455 460
 Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr Tyr Asp Pro
 465 470 475 480
 Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495
 Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Arg Ser Asp Glu Leu
 500 505 510
 Leu His Asn Val Asn Thr Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
 515 520 525
 Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Val Leu Leu Ser Leu Ile Ala Ile
 530 535 540
 Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Lys Asn Thr Pro Val Thr Leu Ser
 545 550 555 560
 Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Lys

565

570

5 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 3

Arg Ala Arg Lys
 1

10 <210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 4

Arg Ala Arg Gln
 1

20 <210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 5

Gln Ala Gln Asn
 1

30 <210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 6

Ile Glu Gly Arg
 1

40 <210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

ES 2 727 836 T3

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 7

Arg Lys Lys Lys
1

5
<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
<400> 8

Gln Asn Gln Asn
1

15
<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
20 <400> 9

Gln Gln Gln Arg
1

25
<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
<400> 10

Ile Glu Gly Arg
1

30
<210> 11
<211> 42
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"
<400> 11

ES 2 727 836 T3

Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
 1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
 20 25 30

Lys Arg Lys Arg Arg Ser Ala Ile Ala Ser
 35 40

5 <210> 12
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"
 <400> 12

Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
 1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
 20 25 30

Lys Arg Lys Arg Arg Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
 35 40 45

10 <210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Desconocido: secuencia promotora subgenómica alfavérica"
 <400> 13

ctctctacgg ctaacctgaa tgga 24

20 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia consenso sintética"

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> /replace="Ile"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 35 <223> /nota="Los residuos indicados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a la anotación de dicha posición"

ES 2 727 836 T3

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Cualquier aminoácido

5 <400> 14

Asp Val Glu Xaa Asn Pro Gly Pro
1 5

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> Virus de la enfermedad del pie y la boca
<400> 15

10

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
1 5

<210> 16
<211> 3
<212> PRT
<213> Desconocido

15

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Desconocido: resto peptídico de unión al receptor de la integrina"

20

<400> 16

Arg Gly Asp
1

<210> 17
<211> 4
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 17

30

tttt 4

<210> 18
<211> 4
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 18

cccc 4

40

<210> 19
<211> 100
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 727 836 T3

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<220>
<221> misc_feature

5

<222> (1)..(100)
<223> /nota="Esta secuencia puede abarcar 3-100 restos"

<400> 19

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
20 25 30

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40 45

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
50 55 60

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
65 70 75 80

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
85 90 95

Lys Lys Lys Lys
100

REIVINDICACIONES

1. Una composición inductora de una respuesta inmunitaria contra el virus respiratorio sincicial (VRS) que proporciona uno o más antígenos del VRS para su uso en un procedimiento para proporcionar inmunidad protectora contra el VRS o la protección de una enfermedad producida por el VRS en un bebé, en el que el procedimiento comprende administrar al bebé a los 4 meses de edad o más joven, la composición inductora de la respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS, en el que dicho bebé era un recién nacido de una mujer a la cual se administró una composición que proporciona uno o más antígenos de VRS que inducía una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS durante el tiempo en el que dicha mujer estuvo embarazada de dicho bebé, en el que el uno o más antígenos de VRS comprenden una glicoproteína VRS F.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada a dicho bebé es una sensibilización o un refuerzo.
3. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada a dicha mujer se administra durante el segundo o tercer trimestre de embarazo.
4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la administración a dicho bebé se produce en uno o más momentos seleccionados entre el grupo que consiste en inmediatamente después del nacimiento, 2 semanas después del nacimiento, 4 semanas después del nacimiento, 6 semanas después del nacimiento, 2 meses después del nacimiento, 3 meses después del nacimiento, y 4 meses después del nacimiento.
5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS que se administró a la mujer y la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada al bebé son iguales.
6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS que se administró a la mujer y la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada al bebé no son iguales.
7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada al bebé comprende una composición de subunidad de VRS, un ácido nucleico, un vector vírico recombinante, o una partícula de un replicón vírico (VRP).
8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada a dicho bebé comprende un ácido nucleico.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 a 7, en la que la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada a la mujer comprende una composición de subunidad de VRS.
10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición inductora de una respuesta inmunitaria dirigida contra el VRS administrada al bebé comprende una partícula de un replicón vírico.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 o 9, en la que la composición de la subunidad de VRS comprende: (a) una o más mutaciones que evitan la escisión en uno o ambos sitios de escisión de la furina de una proteína VRS F; y/o (b) una o más mutaciones en la región del péptido de fusión de una proteína VRS.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en la que el ácido nucleico comprende: (a) ADN; o (b) ARN.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 en la que el ARN es un ARN autorreplicante.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 o 9, en la que la partícula de replicón vírico comprende una VRP de alfavirus.

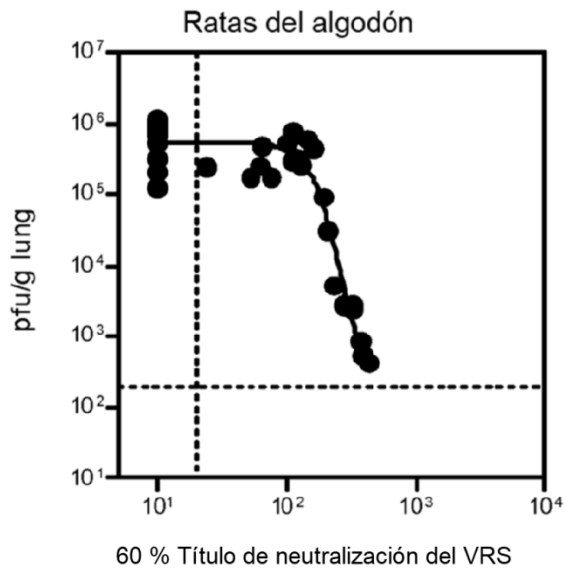


FIG. 1A

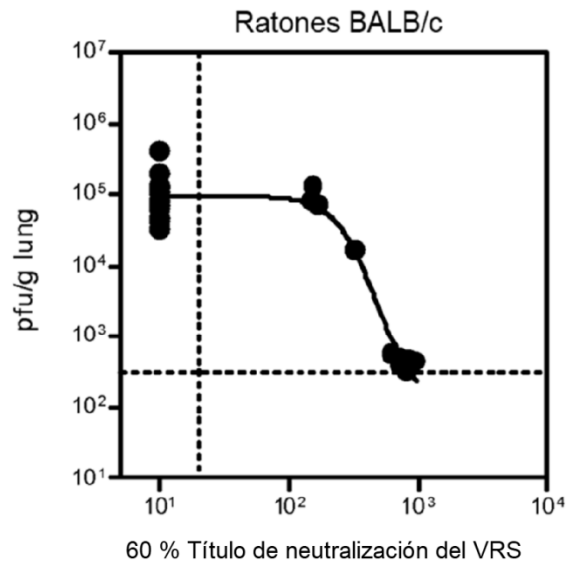


FIG. 1B